

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. G. A. Martini

IMMUNOLOGISCHE
ALDOLASE - ISOENZYMBESTIMMUNGEN IN
MENSCHLICHEN ORGANEN UND NORMALEN UND
PATHOLOGISCHEN SEREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von —

JÜRGEN KORNACHER
—
aus Eutin

Marburg 1976
—

Druck: Görlich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. G.A. Martini

IMMUNOLOGISCHE
ALDOLASE - ISOENZYMBESTIMMUNGEN IN
MENSCHLICHEN ORGANEN UND NORMALEN UND
PATHOLOGISCHEN SEREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

JÜRGEN KORNACHER
aus Eutin

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 11. Mai 1976
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. med. F.-G. Lehmann
Correferent: Prof. Dr. med. G.-A. Martini

INHALTSVERZEICHNIS

=====

Seite

I. Einleitung

1. Definition der Aldolase und ihre physiologische Bedeutung 1
2. Aldolase-Isoenzyme beim Menschen und ihre biochemischen Eigenschaften 1
3. Klinische Bedeutung der Aldolase-Isoenzymbestimmungen im Serum 4

II. Material

1. Gewinnung und Aufarbeitung der Seren und Organextrakte 5
 - a. Seren 5
 - b. Organextrakte 5
2. Reagenzien 5
 - a. Puffer für die Gewinnung der Organextrakte 5
 - b. Puffer für die Immuntitration der Organextrakte 6
 - c. Enzyme 6
 - d. Antiseren 6
 - e. Anti-Kaninchen- γ -Globulin-Serum 7
 - f. Biuret-Reagenz 7

III. Methode

1. Aktivitätsmessung der Gesamtalddolase 8
 - a. Bestimmungsansatz 8
 - b. Durchführung 8
 - c. Berechnung der Enzymaktivität 9

	<u>Seite</u>
2. Immunologische Auftrennung der Aldolase-Isoenzyme im Serum	9
a. Bisherige Methoden	9
α . Semiquantitative Methoden	9
β . Quantitative Methoden	10
b. Mögliche immunologische Methoden	10
α . Differenzmethode	10
β . Hemmungsmessung	11
γ . Direkte Aktivitätshemmung am Immunabsorbens	11
δ . Kombinierte Präzipitations- und Hemmungstechnik	11
c. Immuntitration	12
α . Prinzip	12
β . Antikörperkonzentration	12
γ . Auftreten von Hybriden	13
δ . Berechnung der Isoenzymanteile	13
3. Standardmethode für die quantitative Differenzierung der Aldolase-Isoenzyme aus menschlichen Organen	14
a. Errechnung einer Organextraktmenge für die Präzipitation mit Antiseren	14
b. Präzipitationsansatz für Organextrakte	14
c. Präzipitationsansatz für Seren	14
d. Inkubationsbedingungen	15
e. Messung der einzelnen Isoenzym-Aktivitäten	15
IV. <u>Ergebnisse zur Methodik</u>	
1. Doppel-Antikörper-Bestimmung	16
2. Hemmung und Präzipitation der Gesamaldolase durch Anti-Aldolase-Seren in steigenden Mengen	18

	<u>Seite</u>
a. Hemmung und Präzipitation der Aldolase aus Skelettmuskel durch Anti-Aldolase-A-Serum	19
α . Hemmung	19
β . Praezipitation	20
b. Hemmung und Präzipitation der Gesamt-Aldolase aus Leber durch Anti-Aldolase-B-Serum	21
α . Hemmung	21
β . Praezipitation	22
c. Hemmung und Präzipitation der Gesamt-Aldolase aus Gehirn durch Anti-Aldolase-C-Serum	23
α . Hemmung	23
β . Praezipitation	24
d. Vergleich verschiedener Anti-Aldolase-B-Seren am Beispiel Präzipitation der Aldolase B aus Gehirn	25

V. Klinische Ergebnisse

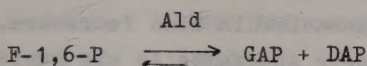
1. Aldolase-Isoenzymbestimmungen in menschlichen Organen	26
a. Aldolase-Isoenzyme in verschiedenen normalen Organen	26
b. Aldolase-Isoenzyme in verschiedenen Muskelgruppen	29
c. Aldolase-Isoenzyme in verschiedenen Gehirnabschnitten	31
d. Aldolase-Isoenzyme bei verschiedenen Lebererkrankungen	32
α . Aldolase-Isoenzyme in pathologischen Lebern	32
β . Aldolase -Isoenzyme bei primärem Leberzellkarzinom	35
γ . Aldolase-Isoenzyme in zirrhotischem Gewebe und primärem Leberzellkarzinom derselben Leber	36

	<u>Seite</u>
2. Aldolase-Isoenzyme im Serum	37
a. Aldolase-Isoenzyme in normalem Serum	37
b. Aldolase-Isoenzyme bei akuten Lebererkrankungen	37
α . Akute Virushepatitis	37
β . Alkoholhepatitis	39
c. Aldolase-Isoenzyme bei Leberzirrhose	39
d. Aldolase-Isoenzyme bei primärem Leberzellkarzinom	41
e. Aldolase-Isoenzyme bei Coma und Praecoma hepaticum	42
f. Aldolase-Isoenzyme bei weiteren Erkrankungen	43
α . Intoxikationen	43
β . Chronische Niereninsuffizienz	44
VI. <u>Diskussion</u>	46
VII. <u>Zusammenfassung</u>	56
VIII. <u>Abkürzungen und Enzyme</u>	57
IX. <u>Literaturverzeichnis</u>	58

I. Einleitung

I. 1. Definition der Aldolase und ihre physiologische Bedeutung

Die Depotform der im menschlichen Organismus bei der glykolytischen Spaltung im Darm entstehenden Zucker, das Glykogen, wird innerhalb der Zelle der Glykolyse unterzogen. Bei diesem intrazellulären Abbau, der nach dem Embden-Meyerhoff-Schema, dem Pentose-Phosphat-Zyklus und anschließendem Übergang in den Zitronensäurezyklus abläuft, spielt die Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase eine entscheidende Rolle. Das entstehende Fructose-1,6-diphosphat (F-1,6-P₂) wird durch Aldolase (Fructose-1,6-diphosphat-D-Glycerin-aldehyd-3-phosphat-Lyase, E.C.4.1.2.13) in die beiden Triosen Dihydroxyacetonphosphat (DAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) gespalten.



Das Glycerinaldehyd-3-Phosphat gelangt über mehrere Zwischenstufen zum Pyruvat und tritt so in den Zitronensäurezyklus ein. Dihydroxyacetonphosphat geht in den Fettsäurestoffwechsel über.

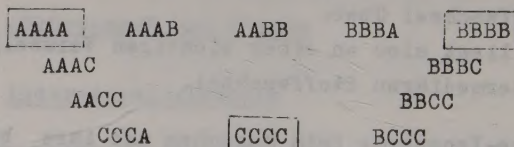
Die Aldolase liegt also an einer wichtigen Verzweigungsstelle im intermediären Stoffwechsel.

I. 2. Aldolase-Isoenzyme beim Menschen und ihre biochemischen Eigenschaften

Es gibt einige Enzyme, die in multiplen molekularen Formen vorliegen. Sind diese genetisch determiniert, werden sie als Isoenzyme bezeichnet (15,42). Zu diesen Enzymen gehören Lactat-Dehydrogenase, Kreatin-phospho-Kinase, Aspartat-aminotransferase, Hexokinase, Pyruvat-Kinase, Malatdehydrogenase, Isocitratdehydrogenase, Alkoholdehydrogenase, α -Amylase, sowie wahrscheinlich einige Enzym-

proteine der alkalischen und sauren Phosphatasen (33,34,42,76). Diese Isoenzyme weisen gleiche Substratspezifität auf, zeigen aber unterschiedliche biochemische Eigenschaften infolge unterschiedlicher genetisch determinierter Primärstruktur (Aminosäuresequenz). Von mehreren Arbeitsgruppen ist in den letzten Jahren nachgewiesen worden, daß die Isoenzyme der Aldolase ubiquitär in vielen menschlichen und tierischen Organen vorkommen, in drei Organen in besonders hohen Konzentrationen (10,51,53). Die Aldolase A kommt als Typ A, die sog. Muskelaldolase, bevorzugt im Herz- und Skelettmuskel, Typ B, die sog. Leberaldolase, in der Leber und Typ C, die sog. Gehirnalldolase, bevorzugt im Gehirn vor (10,42,51).

Diese Isoenzyme treten in drei verschiedenen molekularen Formen auf, es handelt sich hierbei um echte Isoenzyme. Die aktiven Aldolasemoleküle sind Tetramere, die einerseits als reine Polymere andererseits als gemischte Polymere (=Hybride) auftreten (Kombination von drei Untereinheiten) (2,8,11,14,17,22,25,26,49,50,53,67).



Über das Vorkommen von gemischten-Hybriden mit allen drei Untereinheiten ist nichts bekannt. Die reinen Aldolase-Tetramere sind aus menschlichen Geweben in kristalliner Form isoliert worden.

Weiterhin sind folgende Daten bekannt:

Enzymatische Eigenschaften der drei Aldolase-Typen (11)

	<u>Ald A</u>	<u>Ald B</u>	<u>Ald C</u>
V(Fru-1,6-P ₂)	2160 *	576 *	1408 *
V(Fru-1-P)	163 *	624 *	200 *
K _m (Fru-1,6-P ₂)	5x10 M	1x10 M	5x10 M
K _m (Fru-1-P)	4,5x10 M	7,5x10 M	2,5x10 M
<u>Fru-1,6-P₂</u> <u>Fru-1-P</u>	13	0,9	7

Mol Fru-1,6-P₂ bzw. Mol Fru-1,6-P pro Mol Aldolase
(Mol.Gew. 160000), die in 1 Min. bei 25°C gespalten
werden.

Aminosäurezusammensetzung der Aldolase Typen
A, B und C des Menschen (11)

Aminosäure	Mol Aminosäure/ Mol Aldolase *		
	<u>Ald A</u>	<u>Ald B</u>	<u>Ald C</u>
Asp	102	111	117
Thy	83	65	72
Ser	86	79	75
Glu	170	175	165
Pro	113	90	104
Gly	130	117	129
Ala	186	180	180
Cys	vorhanden	vorhanden	vorhanden
Val	74	79	91
Met	16	27	15
Ile	83	77	73
Leu	156	147	135
Tyr	54	41	47
Phe	35	42	39
His	38	40	28
Lys	142	128	109
Arg	69	65	83
<u>Gesamt</u>	<u>1537</u>	<u>1465</u>	<u>1463</u>

* Mol.-Gew. 160000

Beim Vergleich der drei Aldolase-Typen findet man geringe Abweichungen im Aminosäuregehalt bei der Mehrzahl der Aminosäuren.

Molekulargewicht (11)

	<u>Mol.Gew.</u>
Ald A	160000
Ald B	1620000
Ald C	155000

Die Unterschiede der Molekulargewichte bewegen sich im Rahmen der Meßgenauigkeiten der einzelnen Methoden.

I. 3. Klinische Bedeutung der Aldolase-Isoenzymbestimmungen im Serum

Die bisherigen Bestimmungen der Gesamtaktivität der Aldolase ergaben für Skelettmuskelerkrankungen, z. B. bei der progressiven Muskeldystrophie, eine durchschnittliche Steigerung der Gesamtaktivität im Serum um das 10-fache der Norm (13). Auch bei der Dermatomyositis findet sich ein deutlicher Anstieg (1). Ebenfalls beim Herzinfarkt kommt es innerhalb der ersten 12 Stunden zu einem deutlichen Anstieg (72). Bei den Lebererkrankungen findet sich bei der akuten Hepatitis ein signifikanter Anstieg um das 10-fache der Norm (7). Nur geringe Anstiege finden sich bei Leberzirrhose und Verschluß der abführenden Gallenwege (1).

Die Bestimmung der Aldolase-Aktivität fand zwischen 1958-1964 in der klinischen Diagnostik breite Anwendung (1). Sie wurde dann durch die Einführung von organspezifischen Enzymen wie Kreatinphosphokinase (für die Herzinfarktdiagnostik) bzw. Sorbit-Dehydrogenase, Glutamatdehydrogenase und Ornithin-Carbonyl-Transferase (für die Leberdiagnostik) verdrängt.

II. Material

II. 1. Gewinnung und Aufarbeitung der Seren und Organextrakte

II. 1. a. Seren

Untersucht wurden Seren von gesunden Laborarbeitern und Patienten. Die Seren wurden bei -20°C tiefgefroren bzw. sofort aufgearbeitet.

II. 1. b. Organextrakte

Es wurden kleine Gewebstücke (Autopsiematerial, max. 24 Std. post exitum) verwendet. Als normale Gewebsorgane wurden makroskopisch unauffällige Organe verwendet, bei denen klinisch und anamnestisch kein Hinweis für eine Erkrankung bestand. Pathologische Gewebeproben wurden nach dem pathologischen Befund eingeordnet. Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme sofort weiterverarbeitet, um einen Aktivitätsverlust durch Einfrieren auszuschließen.

(Normale und pathologische Organe wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W. Hort, Pathologisches Institut der Univ. Marburg, zur Verfügung gestellt).

Die Gewebsextrakte wurden 1-2 Min. bei 24000 U/min mit einem Ultraturrax-Homogenisator (1:5, Gew:Vol) in einem PBS-Puffer, $\text{pH}=7,4$ homogenisiert. Dieser Rohextrakt wurde für 30 Min. bei 20000 g und $+4^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand - falls erforderlich (z. B. Fettschicht bei Fettleber, Fettherz) - abfiltriert. Dieser klare Rohextrakt wurde weiterbearbeitet.

II. 2. Reagenzien

II. 2. a. Puffer für die Gewinnung der Organextrakte

Es wurde ein Phosphatpuffer mit einer NaCl-Konzentration von 0,9% hergestellt. 54.4 gr. KH_2PO_4 wurden mit 90 gr. NaCl gelöst und auf 10 Liter aufgefüllt. Der pH -Wert wurde mit 0,1 m HCl auf $\text{pH}=7,4$ eingestellt.

II. 2. b. Puffer für die Immuntitration der Organ-extrakte

In 50 ml einer 7,5%igen NaCl-Lösung wurden 0,5 g Human-albumin (reinst, Behring, Marburg) gelöst.

II. 2. c. Enzyme

Biochemica-Test-Kombination, Aldolase, UV-Test (mit NADH)
Boeringer, Mannheim

Konzentration der Lösungen

- 1) Puffer/Substrat (56 mM Collidinpuffer, $p_H=7,4$;
0,3 mM Monojodacetat; 3 mM F-1,6-P₂)
 - 2) Coenzym: NADH (20 mM NADH)
 - 3) Hilfsenzym: LDH/GDH/TIM (2 mg GDH/TIM/ml; 0,5 mg LDH/ml)
- Dazu: NaCl-Lösung 0,9%

II. 2. d. Antiseren

Die Antiseren wurden uns freundlicherweise von dem Leiter der Biochemischen Forschung E. Merck, Darmstadt, Herrn Dr. H. Lang, zur Verfügung gestellt. Sie wurden bei -20°C aufbewahrt und nach dem Auftauen bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Das Prinzip der Gewinnung dieser isoenzymspezifischen Antikörper aus menschlichen Geweben und ihre Verwendung zur Herstellung präzipitierender Antikörper ist von Pfeleiderer et al. beschrieben worden (51).

Charakterisierung (Dr. H. Lang u. Mitarbeiter, Darmstadt)

Bezeichnung der Antiseren

Anti-Ald-A I/1

Anti-Ald-B I/1 ^x

Anti-Ald-C I/1

- ^x Wegen nicht vollständiger Reinheit des Anti-Ald-B I/1 wurde später mit Anti-Ald-B II/1 weitergearbeitet.

Aldolase-Bindungskapazität (Titer)

Anti-Ald-A : 200 μ g/ml

Anti-Ald-B : 400 μ g/ml

Anti-Ald-C : 50 μ g/ml

Spezifität

Anti-Ald-A : Kreuzreaktion mit Ald B : ~4%
mit Ald C : gering

Anti-Ald-B : Kreuzreaktion mit Ald A : < 5%
mit Ald C : < 2%

Anti-Ald-C : Kreuzreaktion mit Ald A : < 1%
mit Ald B : < 2%

Aldolase-Enzymaktivität

Die Aldolase-Aktivität der Antiseren ist weitgehend eliminiert. Folgende Restaktivitäten sind vorhanden:

Anti-Ald-A : 0.2 U/L

Anti-Ald-B : 0.2 U/L

Anti-Ald-C : 0.2 U/L

Wegen der Verdünnung im Ansatz braucht die Eigenaktivität der Antiseren nicht berücksichtigt zu werden.

II. 2. e. Anti-Kaninchen- γ -Globulin-Serum
vom Esel, Behring, Marburg

II. 2. f. Biuret-Reagenz

Nach der Methode von Beisenherz et al. (4),
Merck, Darmstadt

III. Methode

Die folgende Methode fußt auf der Bestimmung von BRUNS (6).

III. 1. Aktivitätsmessung der Gesamtdolase

III. 1.a. Bestimmungsansatz

Wellenlänge : Hg 366 nm
Glasküvette : 1 cm Schichtdicke
Meßtemperatur : 37°C
Messung gegen Leerwert (Luft)

Es wurde nur frisches und hämolysefreies Serum eingesetzt.

Lös1) 2,5 ml Puffer/Substrat-Lösung
Lös2) 0,05 ml NADH-Lösung
Lös3) 0,01 ml GDH/TIM/LDH-Lösung
5 Min. bei 37°C inkubieren

III. 1. b. Durchführung

Nach Zugabe von 0,2 ml Serum (bzw. x- μ l-Extrakt, die Pipettierung erfolgte mit einer Hamiltonspritze), wird gemischt und die Reaktion gestartet. Die Reaktion wird 20 Min. lang verfolgt. Δ_E wird nach 20 Min. im linearen Teil der Reaktion abgelesen und zur Berechnung eingesetzt. Zur Aktivitätsmessung des Skelettmuskels wurde 1 μ l-Extrakt, bei allen übrigen Organextrakten 10 μ l eingesetzt, da bei höheren Extraktmengen, besonders beim Skelettmuskel, die Substratmenge sehr schnell verbraucht war und somit sich kein linearer Verlauf zeigte.

III. 1. c. Berechnung der Enzymaktivität

$$A = \frac{1000 \times V}{\text{min} \times \epsilon \times d \times v} \times \Delta_E \quad [\text{mU/ml}]$$

Der Extinktionskoeffizient ϵ von NADH beträgt bei Hg 366nm 3,3 ($\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$). v ist das Volumen des eingesetzten Serums (bzw. Menge des Extraktes), V die Summe der im Pipettierschema angegebenen Volumina. Da pro Mol Fru-1,6-P₂ 2 Mole NADH umgesetzt werden (s.o.), wird die Gleichung noch durch 2 dividiert.

$$\text{Volumenaktivität} = 42.8 \times \Delta_{E \ 366 \text{ nm}} \quad [\text{mU/ml Serum/ bzw. Extrakt}]$$

Bei hohen Aldolase-Aktivitäten im Serum findet man infolge schnellen Substratverbrauches keine lineare Reaktion. In diesem Fall, bei Δ_E über 0.250/20 Min. wird 0.1 ml Serum mit 0.9 ml einer 0.9%igen NaCl-Lösung gemischt und die gleiche Bestimmung mit 0.2 ml dieser Verdünnung wiederholt. Anschließend Umrechnung mit dem Verdünnungsfaktor.

III. 2. Immunologische Auftrennung der Aldolase-Isoenzyme im Serum

III. 2. a. Bisherige Methoden

III. 2. a. α . Semiquantitative Methoden

Bisher wurde das Verteilungsmuster von Isoenzymen in Organen semiquantitativ mithilfe verschiedener Verfahren bestimmt: Ausnützung des pH -Optimums, der Substratspezifität, der Hitzestabilität, durch Zugabe von Aktivatoren und Inhibitoren, durch unspezifische Hemmung und durch Dissoziation (Harnstoff, Aceton, Formol, Natriumdodecylsulfat, etc.) oder durch spezifische oder unspezifische Batch-Absorption (33,34,38,40,42,68,76).

III. 2. a. β . Quantitative Methoden

Auftrennung erfolgte

- a) mithilfe der Elektrophorese und konsekutiver enzymatischer Anfärbung oder aber
- b) mithilfe der Chromatographie und enzyme-spezifischer Aktivitätsmessung im Säuleneluat.

Abgesehen von der Bestimmung der Isoenzyme der Lactat-Dehydrogenase haben - obwohl verhältnismäßig einfach durchführbar - elektrophoretische Verfahren keine Bedeutung erlangt. Manche Isoenzyme sind schwer elektrophoretisch auftrennbar (33,34,68,76). Andere sind instabil und denaturieren während der Elektrophorese (33,34,38, 68,76). Häufig sind die Isoenzymaktivitäten im Serum so niedrig, daß keine oder günstigstenfalls eine qualitative, jedoch keine quantitative Auftrennung möglich ist. Manche Isoenzyme weisen jedoch kein empfindliches enzyme-spezifisches Färbeverfahren auf. Säulenchromatische Techniken, z. B. durch Anionenaustauschchromatographie, sind für Routinebestimmungen zu aufwendig.

III. 2. b. Mögliche immunologische Methoden

III. 2. b. α . Differenzmethode

(= Gesamtaktivität - präzipitierte Aktivität)

Es werden lösliche Antikörper verwendet oder aber Antikörper, die durch Bindung (Antiserum - bzw. γ - Globulin-Fraktion) an eine unlösliche Substanz als Immunabsorbens gebunden sind. Das Isoenzym wird aus dem Gemisch durch Antikörper auspräzipitiert. Die Isoenzymaktivität wird errechnet aus der Differenz der Aktivität vor und nach Präzipitation. Dieses Verfahren ist mit löslichen Antikörpern nur im aufsteigenden Schenkel der Heidelberger-Titrationskurve möglich, d.h., es muß ein Antikörperüberschuß vorhanden sein.

III. 2. b. β . Hemmungsmessung

(= Gesamtaktivität - gehemmter Aktivität)

Es wird die direkte Hemmung des Enzyms durch Antikörper gemessen. Diese Methode ist aber nur anwendbar bei Vorhandensein hemmender Antikörper, d.h., von Antikörpern, die direkt am oder unmittelbar neben dem aktiven Zentrum ihre antigenen Determinanten haben, so daß sie sterisch den Zugang von Substrat und / oder Coenzym hemmen. Eine totale Hemmung wird selten beobachtet. Die Standardisierung bei einer Antikörper-Hemmungsmessung ist durch die biologische Variabilität der Antikörper-Bildung sehr erschwert.

III. 2. b. γ . Direkte Aktivitätshemmung am Immunabsorbens

Das Immunabsorbens bindet isoliert das Isoenzym, gegen welches die immunologischen Antikörper gerichtet sind. Anschließend erfolgt nach Waschung eine direkte Aktivitätsmessung im Überschuß.

III. 2. b. ζ . Kombinierte Präzipitations- und Hemmungstechnik (= Gesamtaktivität - präzipitierte und gehemmte Aktivität)

Die Antigen-Antikörper-Komplexe im Gemisch (Organextrakt - oder Serumprobe und Antiserum) werden nach einiger Zeit abzentrifugiert, der Überstand gemessen und von der Gesamtaktivität subtrahiert. Präzipitierende Antikörper würden ein Isoenzym entfernen, nicht-präzipitierende Antikörper hemmen zumindest partiell ein Isoenzym.

Man erhält bei der Immunisierung selten nur präzipitierende oder nur hemmende Antikörper, sondern in der Regel ein Gemisch aus beiden. Aus praktischen wie auch methodologischen Erwägungen ist die kombinierte Präzipitations- und Hemmungsmessung am leichtesten durchführbar.

Diese wird im Folgenden als "Immuntitration" bezeichnet.

III. 2. c. Immuntitration

III. 2. c. α . Prinzip

Die Aktivität der Isoenzyme A (Muskeltyp), B (Lebertyp) und C (Gehirntyp) der Aldolase wird im Serum und Organextrakten nach folgender Methode quantitativ bestimmt.

Prinzip der Isoenzymdifferenzierung ist eine isolierte Messung der Aldolase-Aktivität vor und nach Präzipitation mit monospezifischen, nicht kreuzreagierenden, präzipitierenden von menschlichen Isoenzym-Antigenen gewonnenen Antikörper gegen genetisch determinierte Untereinheiten, deren Rekombination zu Polymeren (reinen Polymeren oder Hybriden) die biochemisch charakteristischen Isoenzyme ergibt. Aus den Differenzen der Aktivitäten ergibt sich die prozentuale Verteilung der einzelnen Isoenzyme.

III. 2. c. β . Antikörperkonzentration

Zur Präzipitation der einzelnen Isoenzyme wird ein mehrfacher, bis zu 10-facher Überschuß des Antiserums in den Präzipitationsansatz hinzugegeben. Geringere oder höhere Konzentrationen sind ungeeignet, da nur im Antigen-Antikörper-Äquivalenzbereich oder im geringen Antikörper-Überschuß vermieden wird, daß das Antigen (Isoenzym) nur teilweise auspräzipitiert wird (Antigen-Überschuß) bzw. der Antigen-Antikörper-Komplex teilweise wieder in Lösung geht (extremer Antikörper-Überschuß). Die einzusetzende Antikörper-Menge jedes Antiserums wird für Seren bzw. Organextrakte mithilfe der Heidelberger-Kurve ermittelt. Diese erhält man durch Titration eines konstanten Serum-(oder Organextrakt)-volumens mit steigenden Antiserummengen. Aus dem Maximum dieser Heidelberger Kurve geht diejenige Menge an Antiserum hervor, die zu

einer vollständigen Präzipitation einer bestimmten Menge Isoenzym (im Serum bzw. in Organextrakten) erforderlich ist. Man erhält einen ausreichend breiten konstanten Bereich, in welchem die präzipitierte Aktivität unabhängig von der hinzugebenden Menge an Antiserum ist.

III. 2. c. γ . Auftreten von Hybriden

Die Aldolase kommt in den drei Untereinheiten A, B und C vor. Durch Assoziation bilden sich aus je drei dieser Untereinheiten reine Polymere (A_4, B_4, C_4) bzw. Hybride, deren Eigenschaften die Summe der Eigenschaften der Untereinheiten darstellt, sog. Tetramere (11,49,50). Das erklärt die Kombinationsmöglichkeiten der drei Aldolase-Untereinheiten. Demzufolge sind zwölf theoretische Isoenzyme möglich (siehe Abschnitt I/2, wenn man Hybride mit drei verschiedenen Untereinheiten ausschließt). Bei einem Ausschluß von Kreuzreaktionen (nicht völlige Absorption der Antiseren) liegen Hybride vor, wenn die Summe der nach Immuntitration erhaltenen prozentialen Anteile einen Wert ergibt, der über 100% liegt; in diesem Fall werden die Untereinheiten durch alle Antiseren, die gegen die in diesem Hybrid vorliegenden Untereinheiten gerichtet sind, auspräzipitiert (11,51).

III. 2. c. δ . Berechnung der Isoenzymanteile

Bezugswert bei der Berechnung ist die Gesamtaktivität vor der Präzipitation (s.u.). Von diesem Wert werden die folgenden Aktivitäten abgezogen:

Ald A : Aktivität 1 - Aktivität 2

Ald B : Aktivität 1 - Aktivität 3

Ald C : Aktivität 1 - Aktivität 4

Aktivität 1 : Gesamtaktivität

Aktivität 2 : Aktivität nach Zugabe von Anti-Ald-A-Serum

Aktivität 3 : Aktivität nach Zugabe von Anti-Ald-B-Serum

Aktivität 4 : Aktivität nach Zugabe von Anti-Ald-C-Serum

Nach Voruntersuchungen wurde folgende Methode ausgearbeitet:

III. 3. Standardmethode für die quantitative Differenzierung der Aldolase-Isoenzyme aus menschlichen Organen und normalen und pathologischen Seren

III. 3. a. Errechnung einer Organextraktmenge für die Präzipitation mit Antiseren

Nach Messung der Gesamtaktivität erfolgt die Errechnung derjenigen Menge Extrakt, in der ca. 5-15 mU Gesamtaldo-
lase vorhanden sind. Diese Menge wird zur Präzipitation eingesetzt.

(Beispiel: 6000mU/ml $\rightarrow$ Gesamtaldo- lase, 6mU $\rightarrow$ 1 μ l-Extrakt,
d.h., Einsatz von 1-2 μ l-Extrakt)

III. 3. b. Präzipitationsansatz für Organextrakte

Da der Einsatz der zu messenden Probe ein konstantes End-
volumen von 0.5 ml aufweisen soll, muß das Endvolumen
nach Einsatz der verschiedenen Lösungen und Serum/Organ-
extrakte mit einem Puffer korrigiert werden.

(Beispiel: Extrakt Puffer Antiserum
18 μ l 432 μ l 50 μ l

Die Berechnung der Extraktmenge siehe Abschnitt III. 3. a.)

III. 3. c. Präzipitationsansatz für Seren

<u>Ansatz</u>	<u>ml Serum</u>	<u>ml 7.5%NaCl</u>	<u>ml Anti-A</u>	<u>ml Anti-B</u>	<u>ml Anti-C</u>
Nr.					
1	0.4	0.2	-	-	-
2	0.4	0.2	0.020	-	-
3	0.4	0.2	-	0.020	-
4	0.4	0.2	-	-	0.020

Der Leerwert wird jeweils mit 0.020 ml der 7.5%-igen NaCl-Lösung auf das Endvolumen von 0.620 gebracht. Alle Messungen erfolgen in einer Doppelbestimmung.

Bei höheren Gesamtaktivitäten (über 10 mU/ml) wird nach der Heidelberger-Kurve die entsprechend höheren Mengen an Antiserum zugesetzt.

III. 3. d. Inkubationsbedingungen

Der Ansatz wird nach gründlichem Durchschütteln für 1 Std. bei $+37^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad gehalten, anschließend für mindestens 2 Std. bei $+4^{\circ}\text{C}$ in der Kühlzelle aufbewahrt. Danach wird das Immunpräzipitat mit einer Sorvall-Zentrifuge bei 20000 g für 20-30 Min. bei $+4^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert. 0.3 ml des Überstandes (bzw. 0.2 ml des Extraktes) werden dann für weitere 30 Min. auf $+37^{\circ}\text{C}$ erwärmt.

III. 3. e. Messung der einzelnen Isoenzym-Aktivitäten

2.50 ml Puffer/Substrat

0.05 ml NADH/Lösung

0.01 ml GDH/TIM/LDH

(vortemperiert auf $+37^{\circ}\text{C}$)

+

0.3 ml des Überstandes des Serums

(bzw. 0.2 ml des Überstandes des Extraktes)

Die Reaktion wird sofort gestartet und nach 20 Min. wird Δ_E abgelesen.

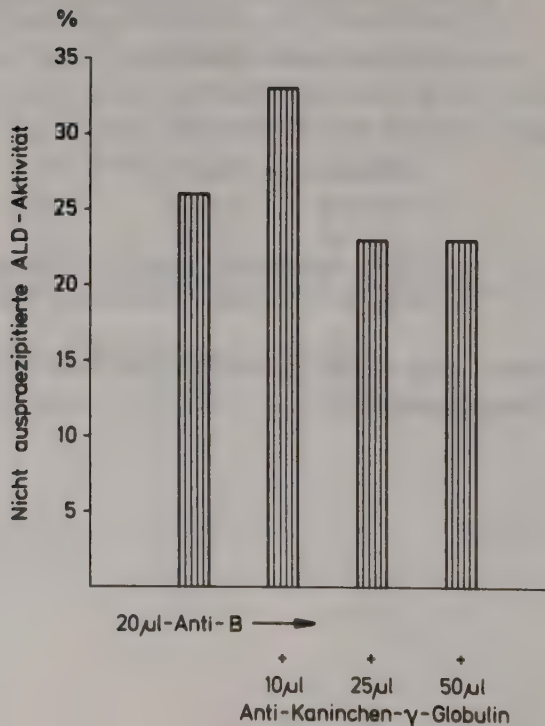
IV. Ergebnisse zur Methodik

IV. 1. Doppel-Antikörper-Bestimmung

Um den Anteil bindender, nicht präzipitierender Antikörper festzustellen, wird in steigenden Mengen Anti-Kaninchen- γ -Globulin-Serum dem Inkubationsgemisch zugegeben. Die Bestimmung wird an Skelettmuskel und Leber durchgeführt, da in diesen beiden Organen fast ausschließlich Aldolase A bzw. Aldolase B vorkommen.

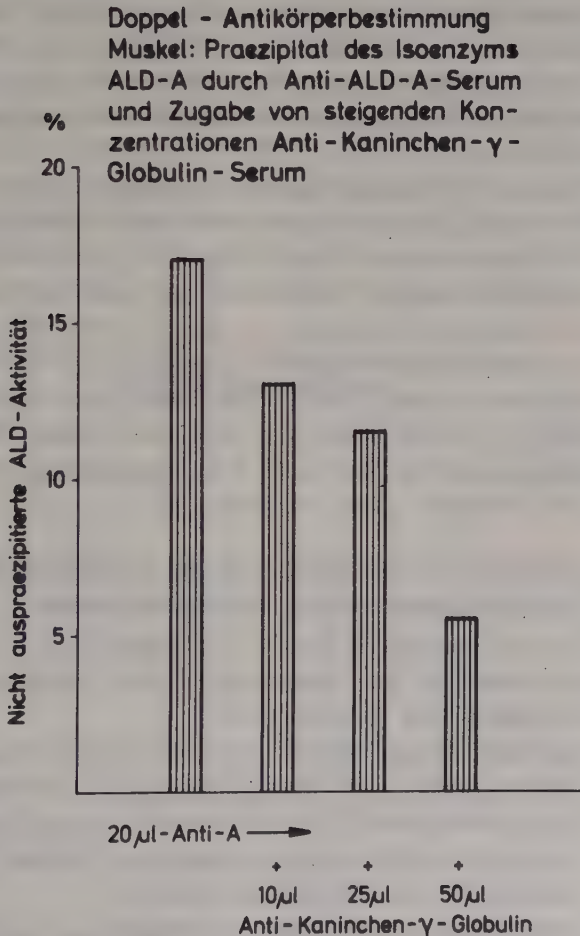
Abb. 1

Doppel - Antikörperbestimmung
Leber: Praezipitat des Isoenzym
ALD-B durch Anti-ALD-B-Serum
und Zugabe von steigenden Kon-
zentrationen Anti - Kaninchen - γ -
Globulin - Serum



Durch Anti-Aldolase-B-Serum ($20\ \mu\text{l}$) wird aus einem Leberextrakt 74 % der Ausgangsaktivität auspräzipitiert (Abb. 1) (26 % der Restaktivität im Überstand). Steigende Mengen von Anti-Kaninchen- γ -Globulin-Serum zeigen, daß eine weitere Auspräzipitation von nicht-präzipitierten AG-AK-Komplexen (Aldolase B und Anti-Aldolase-B) nur in sehr geringem Umfang möglich ist.

Abb. 2



Demgegenüber werden aus dem Skelettmuskelextrakt (Abb. 2) durch 20 μ l Anti-Aldolase-A-Serum 83 % der Gesamtaktivität auspräzipitiert (17 % der Restaktivität im Überstand). Zugabe von 10 μ l Anti-Kaninchen- γ -Globulin erhöht den Anteil auspräzipitierter AG-AK-Komplexe (Aldolase-A und Anti-Aldolase-A-Serum) auf 87 %, 25 μ l Anti-Kaninchen- γ -Globulin auf 88,5 % und 50 μ l Anti-Kaninchen- γ -Globulin auf 94,5 %.

Die Doppel-Antikörper-Methode dient zur Überprüfung nicht-präzipitierender Antikörper. Die maximal auspräzipitierbare Aldolase-A- bzw. Aldolase-B-Aktivität muß im Antikörper-Überschuß bestimmt werden. Die Versuche werden im geringen AG-Überschuß-Bereich durchgeführt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß in Anti-Aldolase-A-Serum (Abb. 2) nicht präzipitierende Antikörper vorhanden sind. In Anti-Aldolase-B-Serum (Abb. 1) ist der Anteil nicht präzipitierender Antikörper sehr gering, da kein weiterer Zuwachs der auspräzipitierten Aktivität erreicht werden konnte.

Anti-Aldolase-C-Serum konnte nicht überprüft werden, da ein Organ mit ausschließlicher oder sehr stark überwiegender Aktivität der Aldolase C im menschlichen Organismus nicht vorkommt (Abb. 10, Tab. I).

IV. 2. Hemmung und Präzipitation der Gesamtalddolase durch Anti-Aldolase-Seren in steigenden Mengen

Durch Zugabe steigender Mengen von Antikörpern und Messung der gehemmten bzw. auspräzipitierten Aktivität im Versuchsansatz wird überprüft, ob

- 1) Hemmung, Präzipitation oder kombinierte Hemmung und Präzipitation die optimale Meßmethode darstellt,
- 2) in welchem Ausmaß für Aldolase A, B und C durch ihre Antiseren partielle oder komplette Hemmung bzw. Präzipitation erzielt werden kann und
- 3) welche Antikörpermengen zur Erzielung einer völligen Bindung benötigt werden.

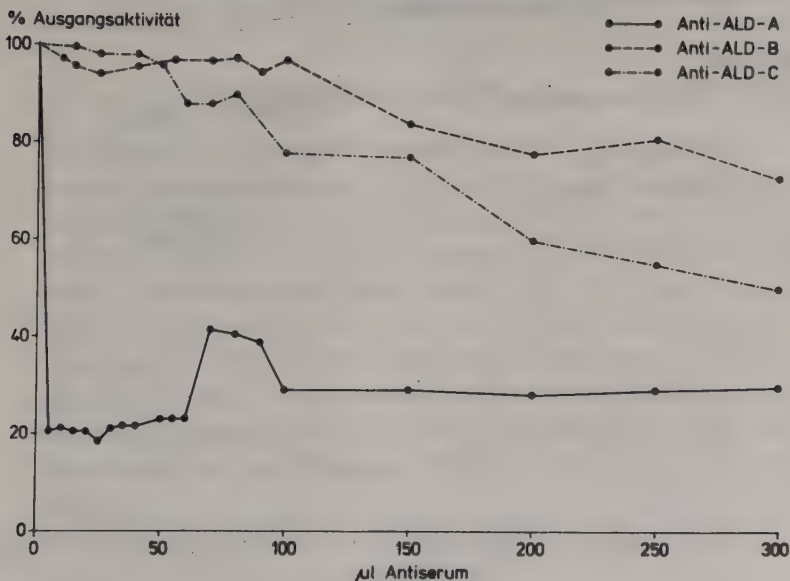
IV. 2. a. Hemmung und Präzipitation der Aldolase aus Skelettmuskel (Quadriceps) durch Anti-Aldolase-A-Serum

IV. 2. a. α . Hemmung

Zu dem Skelettmuskelextrakt wird in steigenden Mengen Anti-Aldolase-Serum hinzugegeben. Abb. 3 zeigt, daß in einem Anti-Serum-Bereich zwischen 5-60 μ l Anti-Aldolase-A-Serum eine optimale Hemmung bis auf 82 % erreicht wird. Bei steigenden Anti-Serum-Mengen geht der AG-AK-Komplex teilweise wieder in Lösung, so daß bei 300 μ l Anti-Serum nur noch 70 % der Ausgangsaktivität gehemmt werden. Innerhalb des optimalen Hemmungsbereiches zeigen die Antiseren B und C nur eine geringe Hemmung von wenigen Prozent. Diese Hemmung ist wahrscheinlich auf kreuzreagierende, nicht absorbierte Antikörper gegen Aldolase A in Anti-Aldolase-A- und Anti-Aldolase-B-Serum zurückzuführen, da Anti-Aldolase-C-Serum erst in einem 12-fachen, Anti-Aldolase-B-Serum in einem 20-fachen Überschuß, im Vergleich zum homologen Antiserum, eine beginnende Hemmung anzeigen.

Abb.3

Hemmung der Gesamt-Aldolase aus Skelettmuskel durch Anti-Aldolase-Seren



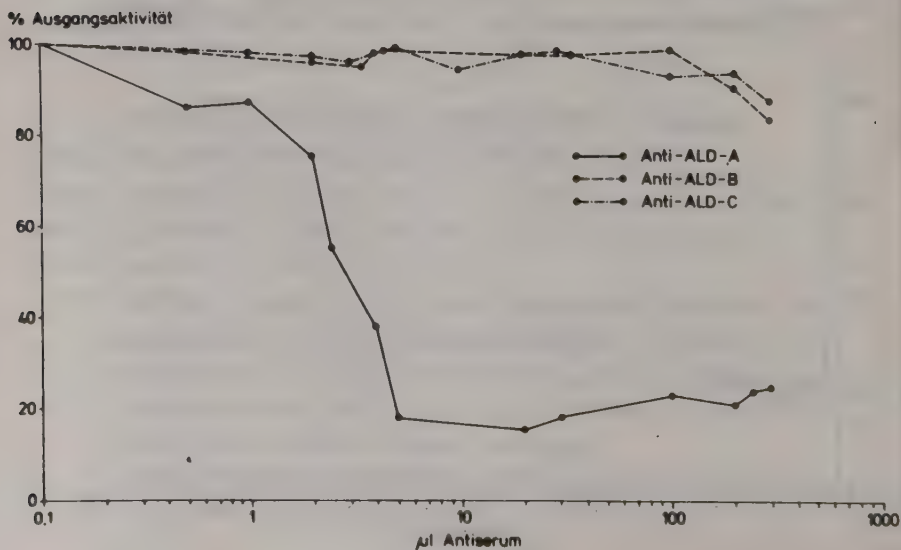
IV. 2. a. β . Präzipitation

Ein ähnlicher Verlauf zeigt sich bei der Präzipitation (Abb. 4, logarithmischer Maßstab der Absizze). Auch hier findet sich eine optimale Auspräzipitation der Gesamtaktivität von 85 % zwischen 5-20 μ l Anti-Aldolase-A-Serum. Bei steigenden Antiserum-Mengen kommt es auch hier zu einer teilweisen Dissoziation des AG-AK-Komplexes. Die fehlenden, nicht auspräzipitierten Aktivitäten setzen sich einerseits aus einem bei 3 % liegenden Anteil von Aldolase B bzw. Alsolase C an der Gesamtaktivität im Skelettmuskel zusammen, andererseits können (Abb. 2) die restlichen 12 % nicht-auspräzipitierter Aktivität durch Anti-Kaninchen- γ -Globulin zu 66 % (Abb. 2) gefällt werden, so daß insgesamt 96 % der Aldolase-A-Aktivität aus Skelettmuskel auspräzipitiert werden kann.

Die Hemmungskapazität beträgt für Anti-Aldolase-A-Serum 170600 mU/ml, die Präzipitationskapazität 176400 mU/ml (ohne Zusatz von Anti-Kaninchen- γ -Globulin).

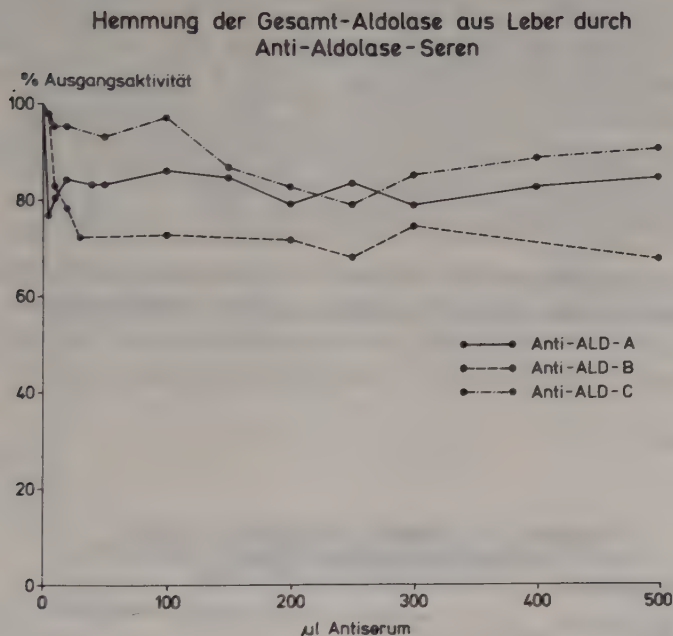
Abb. 4

Praecipitat der Gesamt-Aldolase aus Skelettmuskel durch Anti-Aldolase - Seren



IV. 2. b. Hemmung und Präzipitation der Gesamt-Aldolase aus Leber durch Anti-Aldolase-B-Serum

Abb.5



IV. 2. b. α. Hemmung

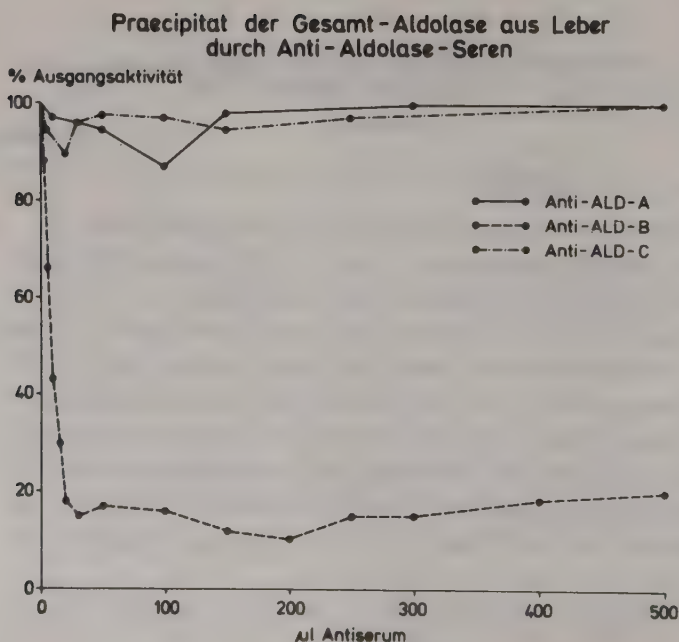
Die Hemmung der Gesamtalldolase aus der Leber (Abb. 5) ergibt für die Aldolase A, B und C bei Antiserum-Mengen zwischen 5-300 µl optimale Hemmungen zwischen 18-31 % der Gesamtaktivität. Anti-Aldolase-A-Serum hemmt optimal, Anti-Aldolase-B-Serum hemmt schlecht (trotz hoher Antiserum-Mengen nur 31%-ige Hemmung) und Anti-Aldolase-C-Serum zeigt Kreuzreaktion von Anti-Aldolase-A- und Anti-Aldolase-B-Serum (die Hemmung der Gesamtalldolase-Aktivität im Skelettmuskel und Leber ist wesentlich höher als der Gehalt von Aldolase C in diesen beiden Organen (Abb. 3 und 5).

IV. 2. b. β . Präzipitation

Durch 20-40 μ l Anti-Aldolase-B-Serum werden 85 %, bei noch höheren Mengen 90 % der Aldolase B auspräzipitiert. Der Anteil nicht-präzipitierter Aktivität ist mit 15 % gering. Anti-Aldolase-A- und Anti-Aldolase-C-Seren zeigen nur minimale Aktivitäten und auch mit der Doppel-Antikörper-Bestimmung ist keine weitere Auspräzipitation (Abb. 1) mehr möglich. Die Leber enthält 4,7 % Aldolase A und 9,6 % Aldolase C (Abb. 10); somit sind über 99 % der Aldolase B auspräzipitiert (einschließlich Zusatz von Anti-Kaninchen- γ -Globulin).

Die Hemmungskapazität beträgt für Anti-Aldolase-B-Serum 310 mU/ml, die Präzipitationskapazität 7000 mU/ml.

Abb. 6



IV. 2. c. Hemmung und Präzipitation der Gesamtalddolase aus Gehirn (Mark) durch Anti-Aldolase-C-Serum

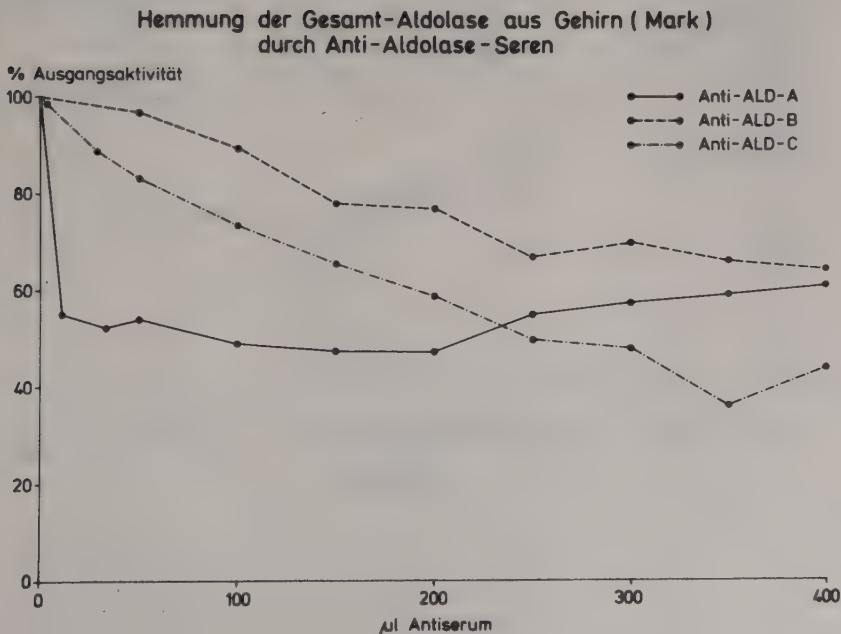
IV. 2. c. . Hemmung

Mit 10-200 μ l Anti-Aldolase-A-Serum werden 50 % Aldolase A gehemmt (Abb. 7). 350 μ l Anti-Aldolase-C-Serum hemmt über 60 %, wobei der AG-AK-Komplex teilweise in Dissoziation übergeht. Aldolase B wird im Gegensatz zu Aldolase A und Aldolase C nur bis auf 30 % gehemmt.

Anti-Aldolase-A-Serum hemmt gut, Anti-Aldolase-B-Serum schlecht - wobei bei hohem Antikörper-Überschuß wohl der Anteil kreuzreagierender Antikörper gegen Aldolase A und Aldolase C eine zunehmende Rolle spielt.

Anti-Aldolase-C-Serum hemmt deutlicher als Aldolase B, was auf die kreuzreagierende Anti-Aldolase-A-Aktivität im hohen Antikörper-Überschuß zurückgeführt werden kann.

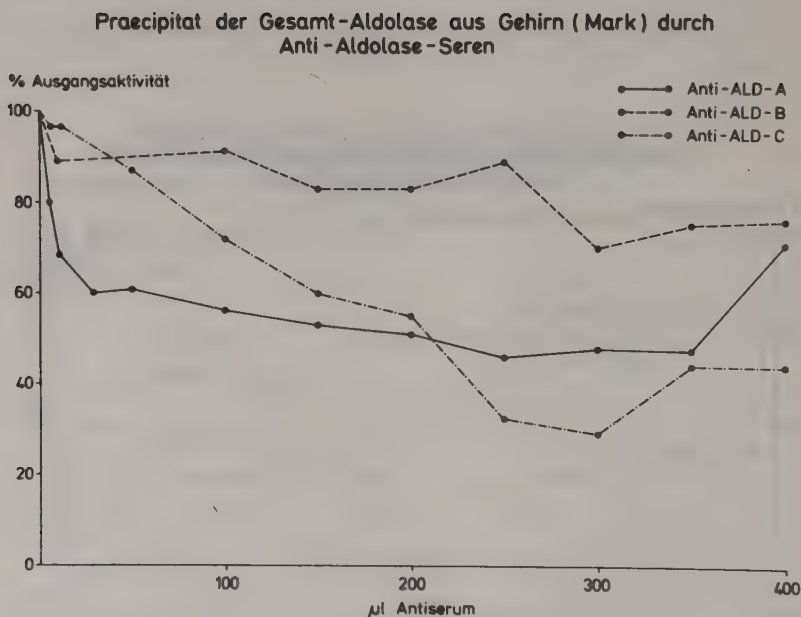
Abb.7



IV. 2. c. β . Präzipitation

Bei der Präzipitation (Abb. 8) findet sich ein ähnliches Bild, wobei allerdings die Aktivität der Aldolase C bis auf über 70 % auspräzipitiert wird. Aldolase C ist relativ instabil. Bei optimaler Auspräzipitation der einzelnen Aktivitäten mit 300 μ l Antiserum weisen über 100 % liegende Gesamtaktivitäten auf das Vorliegen von Hybriden hin. Deshalb läßt sich für Anti-Aldolase-C-Serum keine exakte Bindungskapazität errechnen.

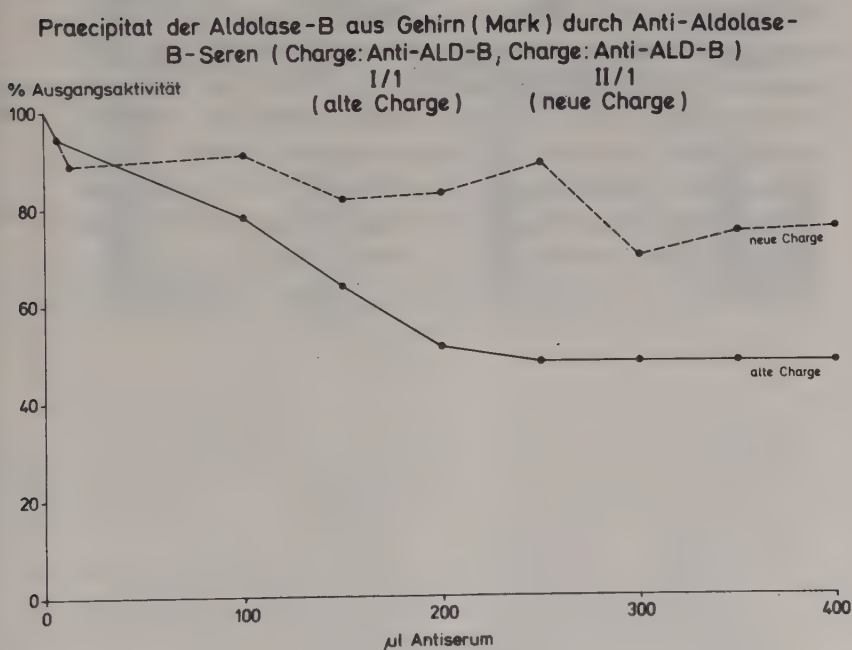
Abb.8



IV. 2. d. Vergleich verschiedener Anti-Aldolase-B-Seren am Beispiel der Präzipitation der Aldolase B aus Gehirn (Mark)

Der progrediente, langsame Abfall mit Charge I/1 weist auf Kreuzreaktionen hin. Die Charge II/1 präzipitiert 20 %, die Charge I/1 50 % der Gesamtaktivität. Aus diesem Grund wurden wegen geringerer Kreuzreaktionen der Charge II/1 alle Untersuchungen des experimentellen und klinischen Teils mit dieser Charge durchgeführt.

Abb. 9



V. Klinische Ergebnisse

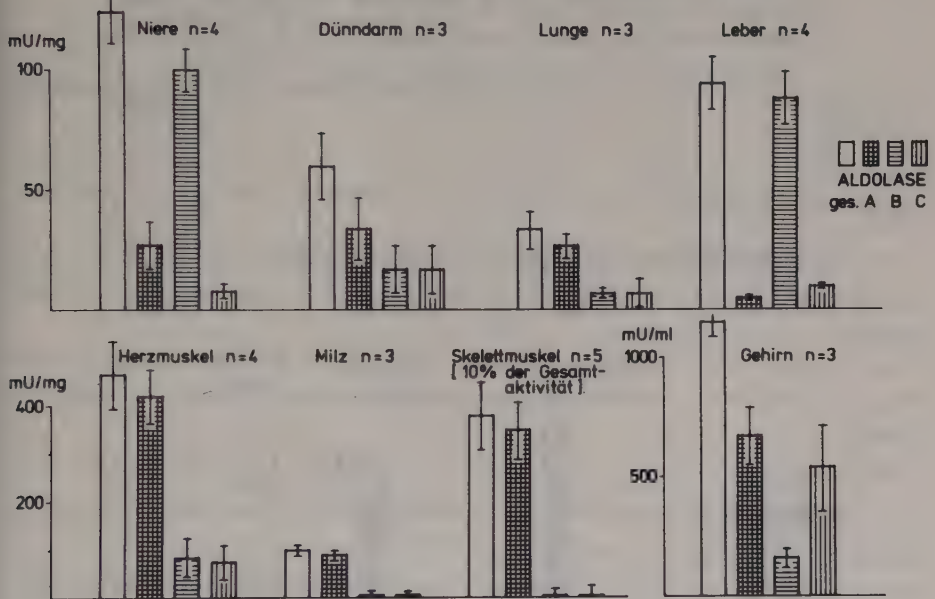
V. 1. Aldolase-Isoenzyme in menschlichen Organen

V. 1. a. Aldolase-Isoenzyme in verschiedenen normalen Organen

Aldolase A kommt in größeren Konzentrationen in Skelettmuskel (91,2 %), Herzmuskel (89,9 %), Gehirn (58 %), Lunge (79 %), Dünndarm (56,7 %) und Milz (89,9 %), Aldolase B in Leber (85,7 %) und Niere (80,6 %) und Aldolase C im Gehirn (47 %) vor (nicht auf 100 % korrigierte Werte) (Tab. I, Abb. 10). In allen Organen liegen die Summen der Isoenzyme über 100 %. Dies weist auf das Vorliegen von Hybriden hin, andererseits kommen diese Werte durch Kreuzreaktionen bei hohem Antikörper-Überschuß zustande. Genauere prozentuale Isoenzymmuster erhält man durch Korrektur der Summe auf 100 %, wobei jedoch die Hybridbildung (mit doppelter Immunpräzipitation ihrer Isoenzyme durch ihre homologen Antikörper, z. B. A_2B_2 , sowohl durch Anti-Aldolase-A- als auch durch Anti-Aldolase-B-Serum) nicht berücksichtigt werden kann.

Abb. 10

Anteile der Aldolase-Isoenzyme in verschiedenen Organen



Einzelergebnisse: Tab. I

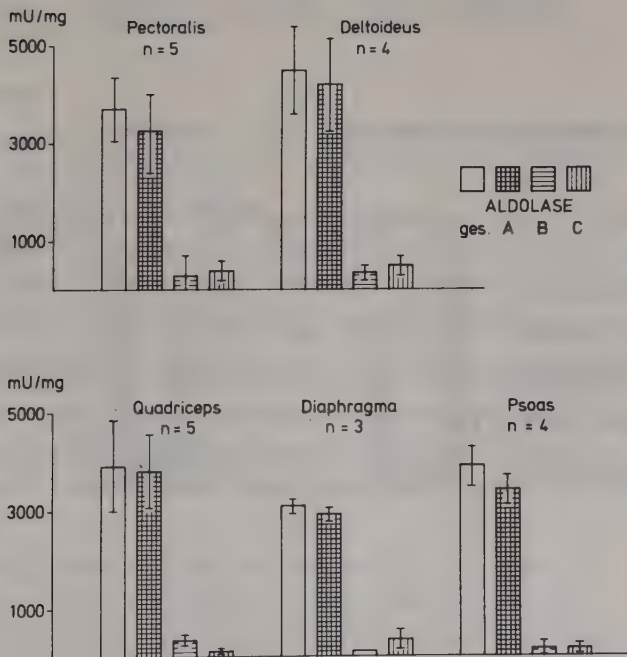
mU/ml	Ges.Ald.		Ald.A		Ald.B		Ald.C				
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	%	σ	$\bar{x}$	%	σ	$\bar{x}$	%	σ
Dünndarm											
n=3	60	14	34	56.7	13	17	28	10	17	28	10
Niere											
n=4	124	13	27	21.8	10	100	80.6	9	8	6.4	3.5
Lunge											
n=3	34	7	27	79	5	7	20.5	2	7	20.5	6
Leber											
n=4	95	11	5	4.7	0.1	90	85.7	11	10	9.6	0.1
Herzm.											
n=4	465	70	418	89.9	55	85	18.2	37	71	15.2	36
Milz											
n=3	98	10	88	89.8	6	7.2	7.3	-	14	14.2	1
Skelett m.											
n=5	3884	63.7	3542	91.2	56	222	5.8	14.1	316	8.4	13.5
Gehirn											
n=3	1150	57	670	58	120	166	14	32	540	47	180

V. 1. b. Aldolase-Isoenzyme in verschiedenen Muskelgruppen

Abb. 11 und Tab. II zeigen gleiche Isoenzymmuster in verschiedenen Skelettmuskelgruppen (n=21). In allen Muskeln überwiegt Aldolase A. (Pectoralis: 90,75 %, Deltoideus: 92,9 %, Quadriceps: 95,6 %, Diaphragma: 94 %, Psoas: 87,3 %), (nicht auf 100 % korrigierte Werte).

Abb.11

Anteile der Aldolase-Isoenzyme im Skelettmuskel



Einzelerggebnisse: Tab. II

mU/ml	Ges.Akt.		Ald.A			Ald.B			Ald.C		
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	%	σ	$\bar{x}$	%	σ	$\bar{x}$	%	σ
Pectoralis n=4	3625	628	3290	90.8	675	281	7.74	388	385	10.6	177
Deltoides n=5	4495	926	4176	92.9	950	340	7.6	138	480	10.6	194
Quadriceps n=5	3944	954	3770	95.6	874	364	9.2	119	127	3.2	47
Diaphragma n=3	3102	125	2918	94	123	102	3.2	36	351	11.3	180
Psoas n=4	3920	395	3420	87.3	282	127	3.3	140	127	3.2	73

Einzelerggebnisse: Tab. III

mU/ml	Ges.Akt.		Ald.A			Ald.B			Ald.C		
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	%	σ	$\bar{x}$	%	σ	$\bar{x}$	%	σ
Großhirnrinde	1013	11.5	536	52.9	40	167	16.5	-	481	47.5	360
Großhirnmark	822	82.5	480	58.4	92	-	-	-	428	52	98
Großhirnkern	1080	45.8	670	62	55	150	18.2	56	530	49	60
Kleinhirnrinde	1380	117	978	70.8	52	194	14	-	853	61.8	140
Kleinhirnmark	1480	28	694	46.9	360	153	10.3	-	965	65.2	250

V. 1. c. Aldolase-Isoenzyme in verschiedenen
Gehirnabschnitten

Anteile der ALDOLASE - Isoenzyme im Gehirn

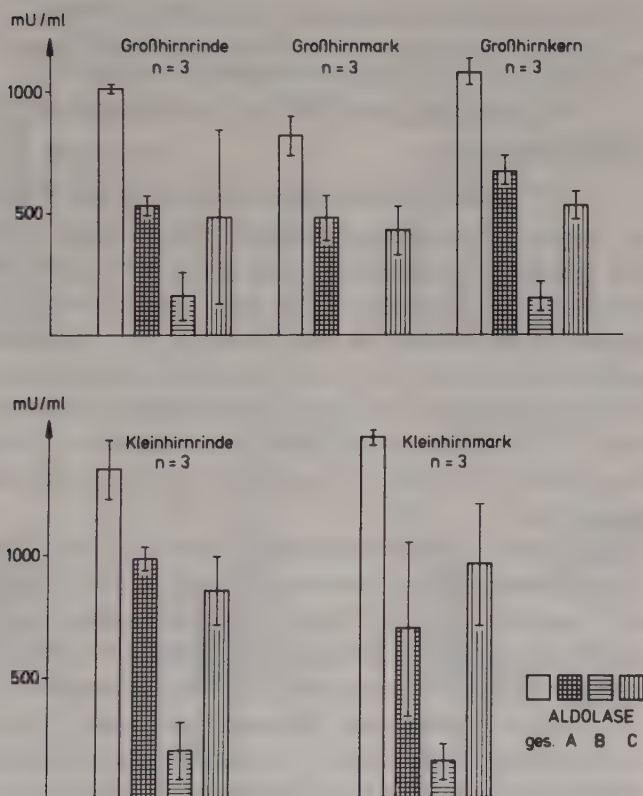


Abb.12

Auch in verschiedenen Teilen des Gehirnes (n=15, Abb. 12 und Tab. III) zeigt sich dasselbe Isoenzymmuster. Kleinhirnrinde und Kleinhirnmark weisen höhere Gesamtaktivitäten auf. Im Großhirnmark findet sich keine Aldolase B. Die Isoenzymverteilung im Großhirn ist bei geringerer niedrigerer Gesamtaktivität im Mark gegenüber Rinde und Kern gleich.

In allen Abschnitten ist die Aktivität der Aldolase A höher als die der Aldolase B und Aldolase C. Aldolase B zeigt nur geringe Aktivität. Die hohe Schwankungsbreite der Aldolase C bei Großhirnrinde ist möglicherweise auf ein Artefakt (große Instabilität der Aldolase post mortem) zurückzuführen. Die Kleinhirnrinde zeigt ähnliche Verteilungen der Isoenzyme wie Großhirnrinde-, -mark, und -kern. Im Kleinhirnmarg überwiegt Aldolase C.

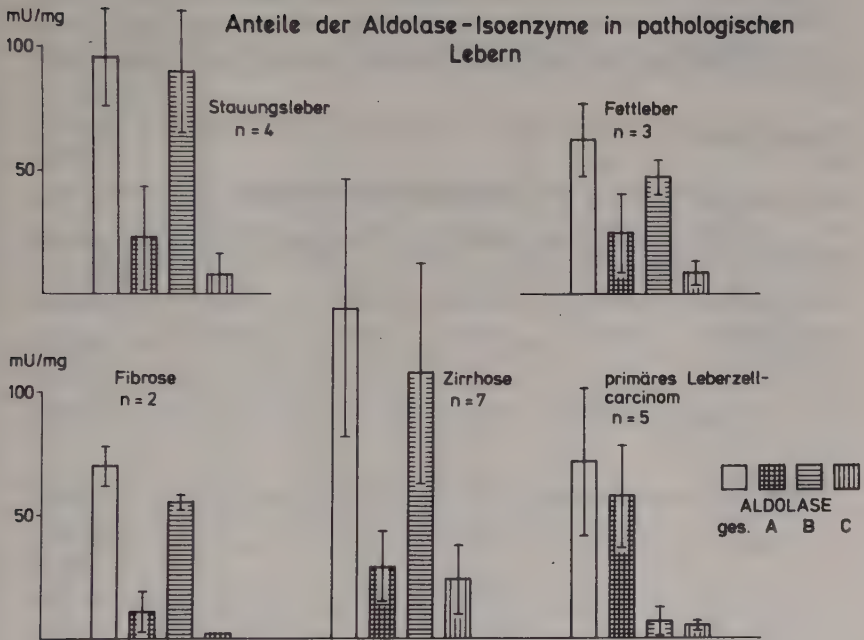
V. 1. d. Aldolase-Isoenzyme bei verschiedenen Lebererkrankungen

V. 1. d. α. Aldolase-Isoenzyme in pathologischen Lebern

Im Vergleich zu normaler menschlicher Leber findet sich bei benignen Lebererkrankungen (Abb. 13) eine deutlich erniedrigte Gesamtaktivität. Bei Leberzirrhose ist die Gesamtaktivität bei großer Streuung von Organ zu Organ im Mittel erhöht. Die stark erhöhte Gesamtaktivität der Zirrhose gegenüber normaler menschlicher Leber ist ungeklärt. Neben der Erniedrigung der Aldolase B fällt ein deutlicher Aldolase A —Anstieg in allen pathologischen Lebern auf.

Beim primären Leberzellkarzinom wird die aus früheren elektrophoretischen Untersuchungen (25,46,47,56,57,58,61, 69) bekannte völlige Umkehr des Isoenzymmusters mit fast ausschließlichem Vorkommen von "fetaler" Aldolase A (in fetaler Leber ist Aldolase A das vorherrschende Isoenzym; (53,54,61) beobachtet. Während Aldolase C in normalen und in pathologischen Lebern in gleichen Konzentrationen vorkommt, ist Aldolase B bei Fettleber, Fibrose und primärem Leberzellkarzinom erniedrigt, bei Stauungsleber, Zirrhose und normaler Leber im gleichen Bereich. Bei allen pathologischen Lebern zeigt sich ein deutlicher Anstieg von Aldolase A (in % der Gesamtaktivität): normale Leber (5,2%), Fibrose (15,6%), Zirrhose (18,0%), Stauungsleber (19,0%), Fettleber (30%) und primäres Leberzellkarzinom (82,7%).

Abb. 13



Einzelergebnisse: Tab. IV

mU/ml	Ges.Akt.			Ald.A			Ald.B			Ald.C		
	$\bar{X}$	%		$\bar{X}$	%	σ	$\bar{X}$	%	σ	$\bar{X}$	%	σ
normale Leber n=4	95	11		5	4.7	0.1	90	85.7	11	10	9.6	0.1
Fettleber n=3	63	15		25	30.5	16	48	58.5	7	9	11	5
Stauungsleber n=4	96	19		23	19	20	90	74.4	24	8	6.6	8
Leberfibrose n=2	71	8		10.5	15.6	8	55	84	3	2	30.5	2
Zirrhose n=7	134	53		29	18	14	108	67	45	24	15	14
primäres Leberzell- karzinom n=5	72	30		58.3	82.7	20	7	9.9	6	5.2	7.4	2

V. 1. d. β . Aldolase-Isoenzyme bei primärem Leberzellkarzinom

Um auszuschließen, daß sich die Aktivitäten und die einzelnen Isoenzymfraktionen in tiefgefrorenen Extrakten bzw. Geweben ändern, werden die Organe von Patienten mit primärem Leberzellkarzinom für 4 Monate bei -20°C tiefgefroren, aufgetaut, homogenisiert und in verschiedenen Portionen wieder tiefgefroren. Bei diesen Organextrakten werden nach verschiedenen Zeiträumen die Isoenzyme gemessen.

Tab. V

	<u>Tag der Aufarbeitung</u>				
<u>Ha.A.</u>	<u>0 Wo</u>	<u>1 Wo</u>	<u>2 Wo</u>	<u>4 Wo</u>	<u>10 Wo</u>
Ges.Akt. mU/ml	348	360	302	267	220
Ald.A	313	299	260	219	161
Ald.B	58	-	-	-	-
Ald.C	55	-	-	-	-

<u>Hap.H.</u>	<u>0 Wo</u>	<u>1 Wo</u>	<u>2 Wo</u>	<u>4 Wo</u>	<u>10 Monate</u>
Ges.Akt. mU/ml	364	316	300	269	64
Ald.A	280	186	190	176	16
Ald.B	99	-	24	12	-
Ald.C	14	-	22	-	-

Die Aldolase-Isoenzyme zeigen bei diesen beiden Patienten im Verlaufe von 1 Woche bis zu 10 Monaten einen kontinuierlichen Abfall der Gesamt-Aktivität und der "fetalen" (Tumor-)Aldolase A. Aldolase B und Aldolase C sind praktisch nicht mehr nachweisbar. Auch bei anderen, nicht länger als 4 Monate tiefgefrorenen Extrakten zeigen sich diese Veränderungen.

2 Patienten, deren Extrakte 3 bzw. 4 Jahre tiefgefroren waren, hatten ebenfalls veränderte Isoenzymmuster (Tab. VI), d.h., eine Einbeziehung dieser Ergebnisse in die Studie ist nicht möglich.

Tab. VI

	<u>Be. A.</u>	<u>Ke. M.</u>
Ges. Akt. mU/ml	280	188
Ald. A	-	5
Ald. B	280	147
Ald. C	-	-

V. 1. d. χ . Aldolase-Isoenzyme in zirrhotischem Gewebe und primärem Leberzellkarzinom derselben Leber

Tab. VII

	<u>Zirrhose</u>	<u>Karzinom</u>
Ges. Akt. mU/ml	524	366
Ald. A	50	311
Ald. B	391	25
Ald. C	-	-

Diese vergleichenden Aldolase-Isoenzymbestimmungen zeigen (Tab. VII), daß die "fetale" Aldolase A vom primärem Leberzellkarzinom synthetisiert wird (85,0 % Aldolase A), während das umgebende zirrhotische Gewebe vorherrschend Aldolase B aufweist (74,6 %).

V. 2. Aldolase-Isoenzyme im Serum

V. 2. a. Aldolase-Isoenzyme in normalem Serum

In den Seren von 20 Normalpersonen (Abb. 17) findet sich eine Gesamtaktivität von 1.9 mU/ml ($\zeta = 0.4$ mU/ml), eine Aldolase-A-Aktivität von 1.5 mU/ml ($\zeta = 0.3$ mU/ml), eine Aldolase-B-Aktivität von 0.15 mU/ml ($\zeta = 0.15$ mU/ml) und eine Aldolase-C-Aktivität von 0.3 mU/ml ($\zeta = 0.1$ mU/ml).

V. 2. b. Aldolase-Isoenzyme bei akuten Lebererkrankungen

V. 2. b. a. Akute Virushepatitis

Abb. 14 zeigt einen Patienten, bei dem über 4 Wochen gleichzeitige Bestimmungen der Aldolase-Isoenzyme, GOT, GPT und des Bilirubins durchgeführt wurden.

Bei der akuten Virushepatitis kommt es zu einem isolierten Aldolase-B-Aktivitätsanstieg ins Serum als Ausdruck des aktuellen Leberzellunterganges. Neben einem Abfall der Gesamtaktivität der Aldolase kommt es ebenfalls zu einem konstanten Abfall der GOT, GPT und des Bilirubins auf Normalwerte.

Bei 15 Patienten mit akuter Virushepatitis zeigt sich dieses für die akute Hepatitis typische Isoenzymmuster (Tab. VIII).

Die Aldolase-B-Aktivitäten im Serum liegen zwischen 2.2 mU/ml und 16.6 mU/ml und somit bei allen Patienten im pathologischen Bereich. Die Gesamtalldolase ist bei allen Patienten erhöht, die Aldolase A stets unter 3.0 mU/ml, die Aldolase C bei 13 Patienten unter 1 mU/ml, bei 2 Patienten mit 2.3 mU/ml und 1.4 mU/ml erhöht.

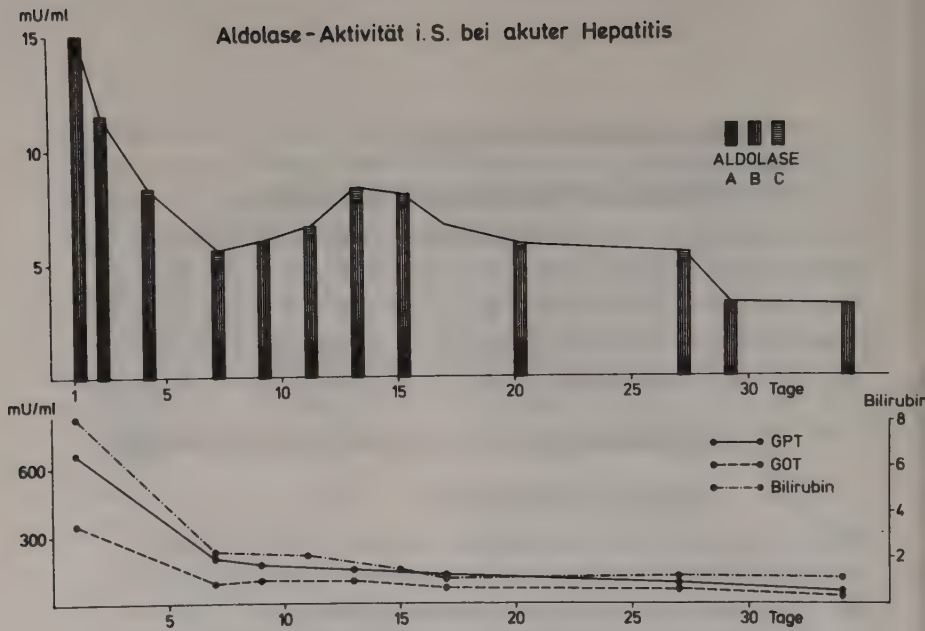


Abb. 14

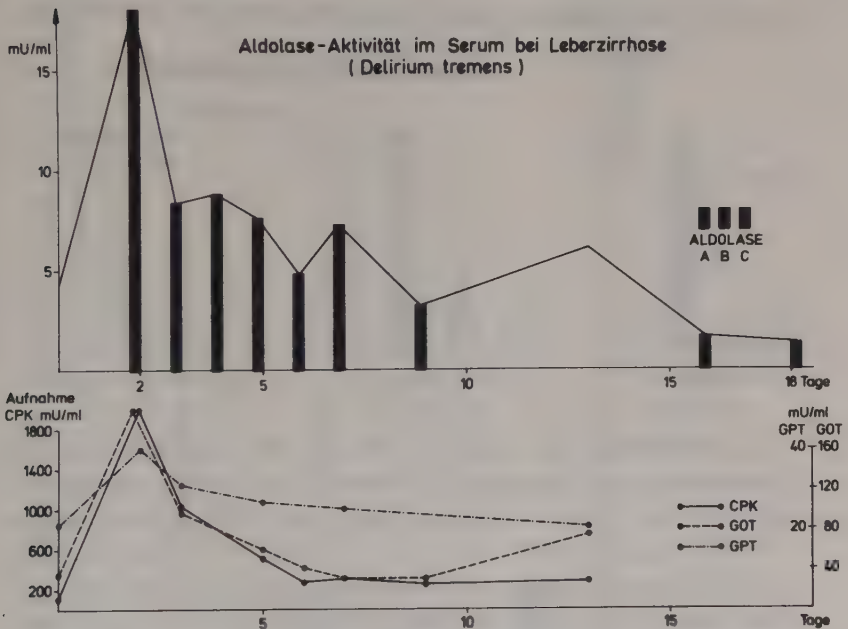
Tab. VIII

Akute Hepatitis n=15 (mU/ml)				
	Ges. Ald.	Ald. A	Ald. B	Ald. C
Kr.	11	1.6	9	0.3
Sche.	12.5	2.14	8.8	0.9
Fr.	15	2.53	12.2	0.2
Hei.	5.4	1.09	2.4	-
Schl.	19.3	1.7	14.6	0.6
Schö.	8	-	6.2	0.4
Schn. G	20.1	2.9	16.6	2.5
Eb.	11.2	1.2	9.6	-
Schn. B.	14.2	2.9	11.3	-
Gr.	7.4	0.8	5.6	0.8
Ew.	9.2	2.3	4.9	2
Schn. M	6.5	0.4	6.1	-
Pr.	18.6	2.1	15.6	0.9
La.	8.4	1.5	6.9	-
Bl.	4.2	1.1	3.1	-

V. 2. b. Alkoholhepatitis

Bei der Alkoholhepatitis (n=3) kommt es neben der Erhöhung der Gesamttaktivität (4.1 mU/ml, 5.4 mU/ml, 3.6 mU/ml) als Folge eines Isoenzymausstromes aus dem Skelettmuskel vorwiegend zu einer Erhöhung der Aldolase A (2.9 mU/ml, 3.4 mU/ml, 2.9 mU/ml). Aldolase B ist in 2 Fällen (1.1 nU/ml, 1.9 mU/ml) auf Grund eines leichten Leberparenchymschadens erhöht. Aldolase C befindet sich im Normalbereich.

V. 2. c. Aldolase-Isoenzyme bei Leberzirrhose

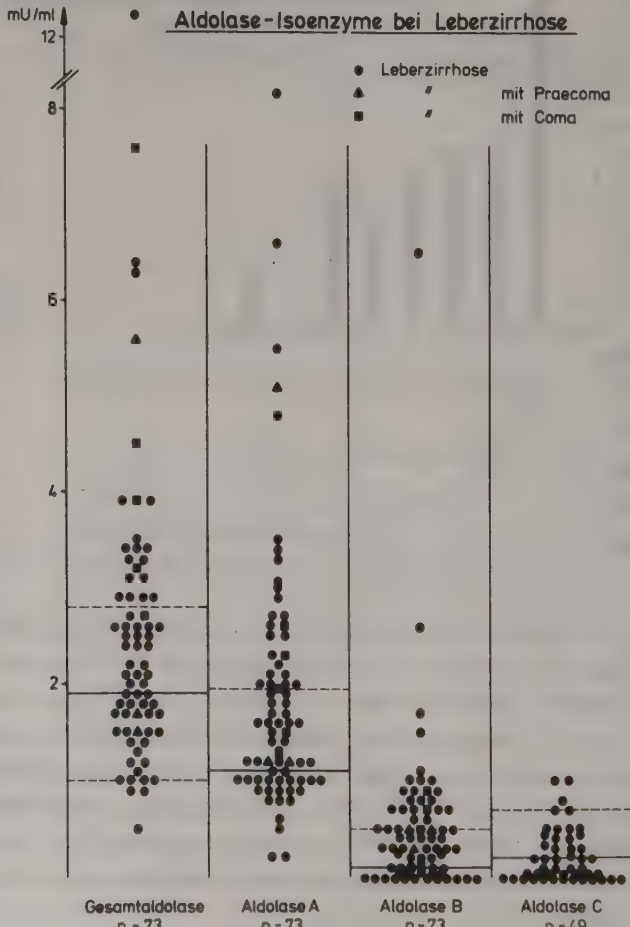


Die Aldolase-Isoenzyme und die Aktivitäten der CPK, GOT und GPT werden bei einem Patienten mit Leberzirrhose, der sich im Delirium tremens befand, über einen längeren Zeitraum in regelmäßigen Abständen gemessen. Es kommt fast ausschließlich zu einem Aldolase-A-Isoenzym-Aktivitäts-Ausstrom in das Serum. Die gleichzeitig bestimmten Werte für die CPK, GOT und GPT zeigen einen parallel zum Abfall der Aldolase-Gesamtaktivität ein kontinuierliches Absinken (Abb. 15).

Abb. 15

Bei 73 Patienten mit Leberzirrhose findet sich 22-mal (=30.1%) erhöhte Gesamtdolase-Aktivitäten. Die Aldolase A zeigt bei 26 Patienten (=35.6%), die Aldolase B bei 23 Patienten (=31.9%) und die Aldolase C bei 3 Patienten (=6.1%) Werte über den 2.576 -Normalbereich von 20 Normalpersonen. Bei erhöhter Gesamtaktivität wird in 83 % gesteigerte Aldolase-A- und in nur 61 % pathologische Aldolase-B-Aktivitäten im Serum beobachtet. Bei normaler Gesamtaktivität liegt die Aldolase A bei 6 % und die Aldolase B bei 16 % der Patienten im pathologischen Bereich. Bei 12 Patienten finden sich sowohl ein Aldolase-A- als auch ein Aldolase-B-Anstieg, bei 15 Patienten eine isolierte Aldolase-A- und bei 11 Patienten eine isolierte Aldolase-B-Erhöhung.

Abb.16



V. 2. d. Aldolase-Isoenzyme bei primärem Leberzellkarzinom

Die Gesamtaktivität bei 22 Patienten mit primärem Leberzellkarzinom (Abb. 17) beträgt $2.6 \text{ mU/ml} \pm 0.7 \text{ mU/ml}$. Das Verhältnis Aldolase A : Aldolase B : Aldolase C ist $1.6 \pm 0.7 : 0.8 \pm 0.3 : 0.2 \pm 0.2 \text{ mU/ml}$.

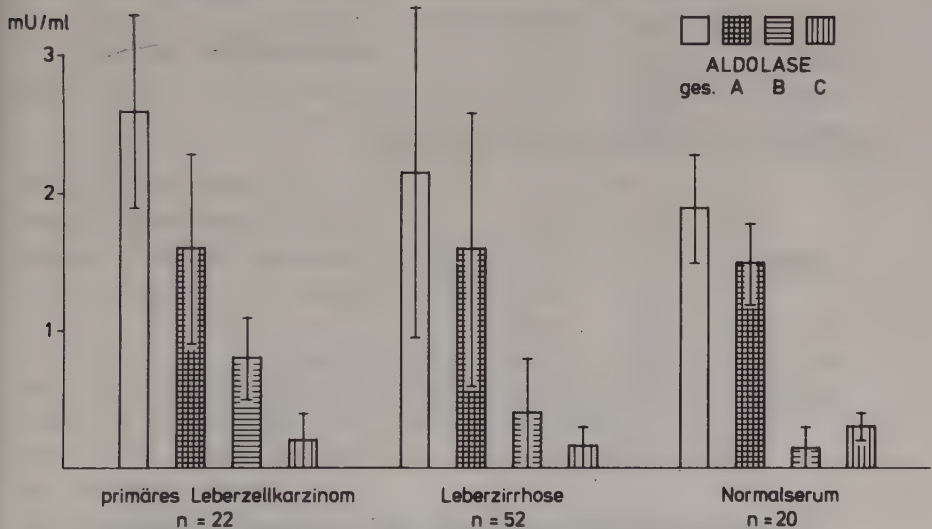


Abb.17

Die Gesamtaktivität bei 52 (der o.a. 73) Patienten beträgt $2.15 \text{ mU/ml} \pm 1.2 \text{ mU/ml}$. Das Verhältnis Aldolase A : Aldolase B : Aldolase C ist $1.6 \pm 1.0 : 0.5 \pm 0.4 : 0.15 \pm 0.15 \text{ mU/ml}$.

Bei den Kzinomen findet sich ein signifikanter Anstieg von Aldolase B im Serum. Dieser Anstieg liegt nicht nur deutlich über den Aldolase-B-Aktivitäten aus normaler Leber, sondern er liegt auch höher als die pathologische Aldolase-B-Erhöhung, die bei der Zirrhose beobachtet worden ist. Demgegenüber sind Aldolase A und Aldolase C bei Zirrhose, Karzinom und Normalpersonen im selben Bereich. Die Isoenzymmuster mit Überwiegen von Aldolase A in Hepatomgeweben wird nicht im Serum widergespiegelt.

V. 2. e. Aldolase-Isoenzyme bei Coma (n=4) und Präcoma hepaticum (n=3)

Tab. IX

Coma hepaticum

	<u>Ges.Ald.</u>	<u>Ald A</u>	<u>Ald B</u>	<u>Ald C</u> (mU/ml)
Mi.A.	3.2	2.0	0.5	0.1
We.M.	3.9	2.3	0.7	-
Co.H	2.7	1.5	0.7	0.1
Wa.M.	4.5	2.6	0.9	1.0

Präcoma

St.J.	1.7	1.2	0.5	-
Ko.B	1.5	1.2	0.3	-
Sau.H.	5.6	5.1	0.5	0.4

3 Patienten mit Coma hepaticum und 1 Patient mit Präcoma hepaticum haben erhöhte Gesamtaktivitäten. Bei diesen findet sich auch gleichzeitig eine erhöhte Aldolase-A-Aktivität, möglicherweise als Ausdruck Muskelzellunterganges. Aldolase B ist in 2 Fällen, Aldolase C bei 1 Patienten erhöht. Hinter der erhöhten Gesamtaktivität verbirgt sich demnach nur ein geringerer hepatogener Isoenzymausstrom in das Serum.

V. 2. f. Aldolase-Isoenzyme bei weiteren Erkrankungen

Orientierend werden bei Erkrankungen, bei denen primär multiple Organschäden vorliegen, die Aldolase-Isoenzyme bestimmt. Diese Untersuchungen dienen der Frage, ob die Aufschlüsselung der Gesamtaktivität in ihre Isoenzyme bei multiplen Organschäden im Einzelfall differentialdiagnostisch von Bedeutung sein kann.

V. 2. f. α . Intoxikationen

Tab. X

	Ges.Akt.	Ald A	Ald B	Ald c (mU/ml)
Scha.D. (unbekannt)	5.2	5.1	-	0.1
Nau.B. (Resedorm, 50 Stk.)	3.2	2.2	0.6	0.4
Geb.A. (Medinox, Adumbran)	2.9	2.5	0.4	-
Se.P. (Thyroxin, 20 Stk.)	2.1	1.6	0.5	-

Bei den 4 untersuchten Patienten zeigt sich dreimal eine Erhöhung der Aldolase A, dreimal eine Erhöhung der Aldolase B und einmal der Aldolase C. Die Gesamtaktivität ist zweimal erhöht.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Einzelisoenzyme auch dann erhöht sein können, wenn die Gesamtaktivität im Normbereich liegt und daß es vorwiegend zu einer Schädigung von Muskelgewebe, aber auch in geringerem Ausmaß der Leber kommt, deren Aldolase-B-Ausstrom bei der Bestimmung der Gesamtaktivität durch die deutliche Erhöhung der Aldolase A verdeckt wird. Weiterhin läßt sich diesen Ergebnissen entnehmen, daß Isoenzymbestimmungen empfindlicher sind und auch die Erkennung geringerer Schäden zuläßt.

V. 2. f. . Chronische Niereninsuffizienz

Auftrennung der Aldolase-Isoenzyme bei chr. Niereninsuffizienz

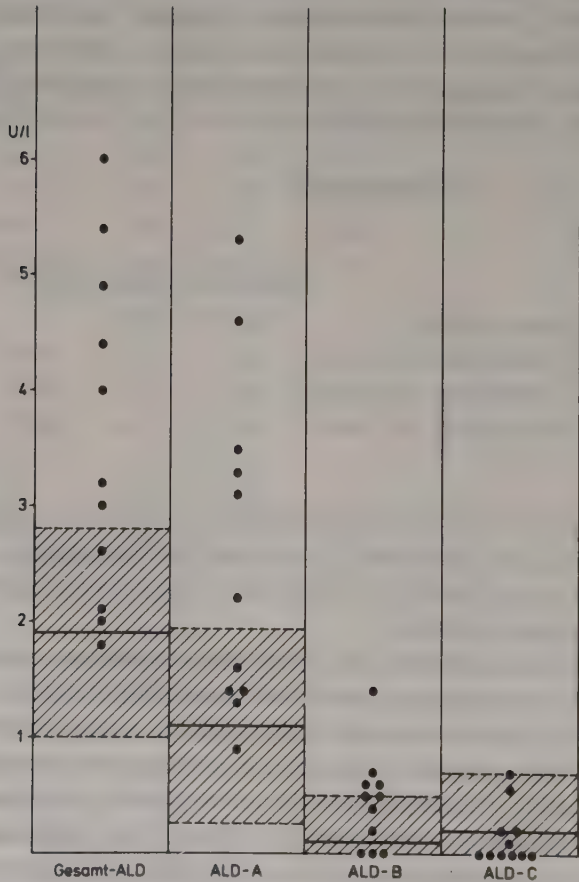


Abb. 19

Bei chronischer Niereninsuffizienz (Peritoneal- und Hämodialyse-Patienten) sind die Gesamtkativitäten von 11 untersuchten Patienten 7-mal im pathologischen Bereich, Aldolase A in 6 Fällen, Aldolase B in 4 und Aldolase C bei keinem Patienten erhöht. (Abb. 18)

Durch Aufschlüsselung der Gesamtaktivitäten in ihre Isoenzymanteile ergibt sich bei 6 Patienten, daß die Aldolase-Isoenzyme eindeutig nicht aus dem Nierengewebe sondern aus dem Muskelgewebe entstammen. In 4 Fällen kan eine Erhöhung der Aldolase B (Niere- oder Leberzelluntergang) gefunden werden.

Dies weist darauf hin, daß die Erhöhung der Enzymaktivität bei multiplen Organschäden sehr häufig nicht auf die primäre Organschädigung zurückzuführen ist. Selbst Organschäden, die klinisch nicht im Vordergrund stehen, können durch Ausstrom eines anderen Isoenzymes ins Serum zu einer Erhöhung der Gesamtaktivität führen.

Die gleichzeitige Bestimmung der CPK zeigt bei allen 11 Patienten Normalwerte. Dies weist darüberhinaus hin, daß die Bestimmung von konventionellen, sog. organspezifischen Enzymen bei unterschiedlicher Halbwertszeit die organorientierte Zuordnung erhöhter Gesamtaktivität anderer Enzyme nicht immer erlaubt.

VI. Diskussion

Die meisten in der klinisch-chemischen Diagnostik interner Erkrankungen angewandten Enzyme werden in verschiedenen menschlichen Organen in hoher Konzentration gefunden (3,5,23,24,55,63). Dieses ubiquitäre Vorkommen im menschlichen Organismus schränkt die diagnostische Bedeutung dieser Enzymreaktionen erheblich ein. Um dieses differentialdiagnostische Dilemma zu umgehen, haben die Bestimmungen organspezifischer Enzyme, die Erstellung von Enzymmustern und die Auftrennung von Gesamtenzymaktivitäten in ihre Isoenzyme Bedeutung erlangt. Die Bestimmung von sog. organspezifischen Enzymen, wie der Kreatinphosphokinase (9,12,16,41), der Myokinase (41,66), der Ornithin-carbamyl-Transferase (52), der Sorbitdehydrogenase (21), der Lipase (74), u.a. hat mit Ausnahme der Herzinfarktdiagnostik (Kreatinphosphokinase) und der akuten Pankreatitis (Lipase) keine wesentliche Bedeutung erlangt, weil auch diese Enzyme nicht streng organspezifisch sind, teilweise selbst in multiplen molekularen Formen vorkommen (z.B. Kreatinphosphokinase), ihre Reaktionen aus methodischen Gründen störanfällig sind (z.B. Myokinase durch Hämolyse), oder ihre Nachweismethoden relativ unempfindlich sind und daher erst bei erheblichen Organschäden Enzymaktivitätserhöhungen im Serum gefunden werden (Ornithin-carbamyl-transferase und Sorbitdehydrogenase).

Serumenzymmuster bieten zur organ- bzw. krankheitsspezifischen Differentialdiagnostik insbesondere beim Myocardinfarkt und in der Differentialdiagnose verschiedener Lebererkrankungen wertvolle Hinweise (5,41,62,63,73).

Der relativ hohe technische Aufwand durch gleichzeitige Bestimmungen mehrerer Enzymaktivitäten kann durch Analyseautomaten relativ gut bewältigt werden, die anfallenden Ergebnisse müssen jedoch am Krankenbett von einem klinisch tätigen Arzt zueinander und zum klinischen Bild in Beziehung gesetzt werden, was erfahrungsgemäß im Gegensatz zur Beurteilung durch einen klinischen Chemiker große Schwierigkeiten bereitet (32) und einen relativ hohen Rechenaufwand erfordert. Die völlig andere Art differentialdiagnostischer Überlegungen, die ein klinischer Chemiker bei der Beurteilung von Serumenzymmustern anstellen muß im Gegensatz zum Kliniker, der in der Regel von der Differentialdiagnostik ähnlicher Krankheitsbilder ausgeht, erklärt, warum selbst theoretisch sehr gut fundierte Serumenzymmuster sich in der klinischen Routinediagnostik nicht durchgesetzt haben (32).

Der logische Weg einer Verfeinerung der Differentialdiagnostik ist die Auftrennung pathologisch erhöhter Gesamtenzymaktivitäten von Enzymproteinen, die in multiplen molekularen Formen vorkommen. Genetisch determinierte multiple molekulare Formen werden Isoenzyme genannt (12,42). Bisher scheiterte die Isoenzymdiagnostik am methodischen Aufwand und/oder an der methodischen Genauigkeit der Isoenzymdifferenzierung. Klinische Bedeutung hat bisher lediglich die Auftrennung der Lactat-Dehydrogenase in ihre Isoenzyme durch enzymelektrophoretische Methoden erlangt (11,30,34,38,40,76,78). Die Auftrennung erhöhter LDH-Enzymaktivitäten im Serum in ihre Isoenzyme erlaubt die Differenzierung zahlreicher pathologischer Zustände, die Erkennung multipler Organschädigungen und den Nachweis minimaler Organschäden, wenn durch Erhöhung eines Isoenzymes in den pathologischen Bereich diese Erhöhung in der Gesamtaktivität "verborgen" ist und nicht zu einer Erhö-

hung der Gesamtaktivität führt (19,30,38,40,65,78). Grundsätzlich müßten diese positiven Erfahrungen an der Lactat-Dehydrogenase auch auf andere Enzyme übertragbar sein, wenn entsprechende methodische Voraussetzungen gegeben sind.

Die Arbeiten von NEUMANN und PFLEIDERER an der Hexokinase (43), von JOCKERS-WRETOU und PFLEIDERER an der Kreatin-Phosphokinase (27,28), von LEHMANN an der alkalischen Phosphatase (35,36,37) und von PFLEIDERER, DIKOW und FALKENBERG an der Aldolase (51,77) haben einen neuen Weg der immunologischen Isoenzymdifferenzierung durch Immuntitration mit monospezifischen Antikörpern gegen genetisch determinierte Unter_einheiten (aus denen sich die Isoenzyme zusammensetzen) gezeigt, nachdem bereits frühere Untersuchungen an den Transaminasen (LANG und MASSARAT (31) und der Lactat-Dehydrogenase (NISSELBAUM und BODANSKY (45) die grundsätzliche Möglichkeit der immunologischen Isoenzymdifferenzierung gezeigt hatten. Die selektive Präzipitation von Isoenzymen durch monospezifische Antikörper erlaubt die immunologische Differenzierung von Isoenzymen durch Kontrolle der photometrisch gemessenen Enzymaktivität. Voraussetzung ist eine völlige Verschiedenheit der Enzymproteinoberflächen der Isoenzyme oder, wenn teilspezifische Proteinsequenzen an der Oberfläche vorhanden sind (gemeinsame antigene Determinanten), eine Absorption der Antiseren, so daß sie schließlich monospezifischen Charakter haben. Eine weitere Voraussetzung ist die völlige Präzipitation der Isoenzyme durch ihre Antikörper (Vorhandensein fast ausschließlich präzipitierender Antikörper), sowie ein relativ weiter Antigen-Antikörper-Äquivalenzbereich bei der immunologischen Reaktion.

Nach Erarbeitung der methodischen Voraussetzungen können diese Untersuchungen einfach in einem Routinelabor durchgeführt werden, da außer einer Zentrifuge und einem Photometer weitere technische Hilfsmittel nicht benötigt werden.

Mit Hilfe präzipitierender Antikörper gegen Aldolase A, Aldolase B und Aldolase C kann die Gesamtal dolase-Aktivität in menschlichen Organen und im Serum differenziert werden (11,51,77). Unsere Untersuchungsergebnisse zur Methodik der Immuntitration zeigen, daß Anti-Aldolase-A-Serum neben einer guten Präzipitation eine hohe Hemmung des Aldolase-A-Moleküls aufweist. Dies weist darauf hin, daß diese Antiseren (auch wenn sie als kreuzreagierende Bestandteile nicht völlig absorbiert er Anti-Aldolase-B- oder Anti-Aldolase-C-Seren auftreten) Antikörper gegen das aktive Zentrum des Aldolase-A-Moleküls bzw. Antikörper gegen die Umgebung des aktiven Zentrums der Aldolase A aufweisen. Demgegenüber präzipitieren Anti-Aldolase-B- und Anti-Aldolase-C-Seren bei geringer Hemmung ihre homologen Antigene. Die Präzipitation von Aldolase-B-Anti-Aldolase-B-Komplexen kann durch Zugabe von Anti-Kaninchen- γ -Globulin-Serum in der Doppel-Antikörper-Methode verbessert werden, desgleichen verbessert Zusatz von Polyäthylenglykol die Präzipitation von Antigen-Antikörper-Komplexen. Unsere methodischen Ergebnisse zeigen, daß diese Präzipitation in einem sehr breiten, über mehrere Zehnerpotenzen reichenden Bereich beobachtet werden kann. Da ein zu hoher Antikörper-Überschuß jedoch die methodische Genauigkeit durch die in diesem Bereich dann prozentual deutlich ansteigenden nicht absorbierten Antikörper-Konzentrationen gegen die heterologen Aldolase-Moleküle beeinflusst, sollten die Messungen nur in einem geringen Antikörperüberschuß durchgeführt werden. Aus diesem Grund ist die vorherige Bestimmung der Gesamtaktivität und die

Errechnung des optimalen Probeeinsatzes in einen Standardansatz (mit konstanter Antikörpermenge) erforderlich. Unsere Untersuchungen zeigen, daß mit Ausnahme der Aldolase A, für die sowohl Hemmungs- wie Präzipitationsmessungen gleichgute Resultate ergeben, Hemmungsmessungen alleine unbefriedigende Resultate erbringen. Die kombinierte Hemmungs- und Präzipitationsmessung mit Messung der Aktivität im Überstand nach Entfernung des Antigen-Antikörper-Komplexes zeigt sich an anderen Verfahren deutlich überlegen. Einzige Schwierigkeit ist das Vorkommen von Hybriden im Serum, deren Messung (Gesamtaktivität dann über 100 %), Zuordnung zu bestimmten Organen (Organe mit verschiedenen Aldolase-Isoenzym-Anteilen und/oder hypothetische Möglichkeit der Neubildung von Hybriden im Serum) und klinische Interpretation schwierig ist.

Unsere Aldolase-Isoenzymbestimmungen in verschiedenen menschlichen Organen haben gezeigt, daß innerhalb eines Organs auch bei histologischen Unterschieden in der Regel das Isoenzyymmuster sich nur unwesentlich ändert.

Aldolase A kommt in größeren Konzentrationen nur im Skelettmuskel, Herzmuskel und Gehirn, Aldolase B in Leber und Niere, sowie Aldolase C im Gehirn vor. Einige dieser Isoenzyme werden in anderen Organen in niedrigen Konzentrationen ebenfalls gefunden, die meisten Organe mit mehreren Aldolase-Isoenzymen weisen darüberhinaus Hybride auf. Diese Ergebnisse stimmen mit den elektrophoretischen Daten von DIKOW (10) und RENSING, SCHMID und LEUTHARDT (53), sowie den immunologisch ermittelten Resultaten von PFLEIDERER, DIKOW und FALKENBERG (51) weitgehend überein.

Demgegenüber werden in pathologisch veränderten Geweben, wie wir an normaler Leber, bei Stauungsleber, Fettleber,

Leberfibrose, Leberzirrhose und beim primären Leberzellkarzinom gezeigt haben, die Isoenzymmuster normaler menschlicher Organe erheblich verändert. Dies beweist frühere elektrophoretische Studien bei neuromuskulären Dystrophien (56,70,71), Sarkomen (29), Fructoseintoleranz (48) und Zirrhose (56). Unsere Untersuchungen im Serum bei diesen Erkrankungen haben bewiesen, daß diese pathologisch veränderten Organisozymmuster auch im Serum wiedergespiegelt werden, d.h. daß bei pathologisch veränderten Organen und Zelluntergang in diesen Geweben nicht immer mit dem Isoenzymaustrom gerechnet werden kann, den man aus dem normalen, pathologisch nicht veränderten Gewebe erwarten würde. So findet man z. B. bei Lebererkrankungen nicht nur die leberspezifische" Aldolase B im Serum, sondern auch, wenn auch in geringerem Ausmaß, einen Anstieg der Aldolase A, die in normaler menschlicher Leber praktisch nicht vorkommt (60). Da bei Stauungsleber, Fettleber, Leberfibrose oder Leberzirrhose ein deutlicher Aldolase-A-Anteil in diesen Geweben nachzuweisen ist, wundert es nicht, daß im Serum dieser Patienten ebenfalls ein geringer Aldolase-A-Anstieg gefunden wird.

Bisherige elektrophoretische Auftrennung der Aldolase in ihre Isoenzyme beim primärem Leberzellkarzinom zeigten ein Wiederauftreten des "fetalen" Leber-Isoenzymusters mit Überwiegen der Aldolase A und Anstieg der Aldolase C (46,48,56,57,58,59,75). Diese Ergebnisse konnten durch Immuntitration bestätigt werden. Der relative und absolute Anteil von Aldolase A steigt jedoch auch in Stauungslebern, Fettlebern, Leberfibrosen und Leberzirrhosen deutlich an, so daß im Gegensatz zu bisherigen Anschauungen dieser Wechsel des Isoenzymusters in Richtung auf das "fetale" Isoenzymmuster der Leber

nicht als karzinomspezifisch angesehen werden kann. Unsere Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, daß es sich hier eher um ein quantitatives Problem handelt, das möglicherweise keinerlei Spezifität für eine maligne Transformation in der Leberzelle besitzt. Aus methodischer Sicht ist erwähnenswert, daß unsere Untersuchungen mit Gewebeproben bzw. Gewebsextrakten aus primären Leberzellkarzinomen gezeigt haben, daß nur die Verwendung frischen autoptisch oder bioptisch gewonnenen Materials zuverlässige Ergebnisse ergibt, da längere Aufbewahrung bei -20°C zu einem Verlust verschiedener Isoenzyme, vorwiegend der Aldolase A, führt.

Unsere Untersuchungen bei Leberzirrhose haben darüberhinaus gezeigt, daß der prozentuale Aldolase-A-Anstieg im Serum nicht nur auf diese veränderten Isoenzymmuster der Ursprungsorgane zurückgeführt werden kann. Die sehr starke Aldolase-A-Erhöhung im Serum bei Leberzirrhose kann nur durch einen zusätzlichen Aldolase-A-Ausstrom aus extrahepatischem Gewebe erklärt werden, wofür in erster Linie Muskelgewebe in Betracht kommt. Bei einigen Patienten haben wir zusätzlich Kreatinphosphokinase-Bestimmungen durchgeführt und einige der Patienten mit hohem Aldolase-A-Anteil im Serum zeigten einen Kreatinphosphokinase-Anstieg im Serum, welcher auf einen Enzymaktivitätsausstrom aus dem Muskelgewebe hinweist. Möglicherweise ist der insbesondere bei alkoholischen Leberzirrhosen hohe gefundene GOT:GPT-Quotient mit einem überproportionalen Anstieg der GOT im Vergleich zur GPT auf einen zusätzlichen Transaminase-Ausstrom aus dem Muskelgewebe zurückzuführen. Diese Ergebnisse bei Leberzirrhose weisen darauf hin, daß sich hinter einer erhöhten Gesamtaktivität nicht nur der erwartete Isoenzymausstrom aus einem geschädigten Gewebe verbergen kann, son-

dem zusätzlich in einem Großteil unserer Fälle sogar einen überwiegenden Ausstrom eines anderen Isoenzym einhältet, das gar nicht aus dem angeschuldigten Organ stammt. Dies zeigt, daß Gesamtaktivitätsbestimmungen von Enzymen, die in mehreren multiplen molekularen Formen in verschiedenen Organen vorkommen, nicht nur bei multiplen Organschädigungen der geringere Organschädigungsanteil leicht übersehen werden kann, sondern auch schwere differentialdiagnostische Fehleinschätzungen dann vorkommen, wenn die im Serum erhöhten Isoenzymaktivitäten gar nicht aus dem primär pathologisch veränderten Organ stammen.

Während bei einfacher Organschädigung, wie z. B. bei akuter Virushepatitis, es zu einem isolierten Ausstrom desjenigen Isoenzym in das Serum kommt, das in dem geschädigten Organ in hoher Konzentration vorliegt (20), findet man bei multiplen Organschädigungen, wie z. B. bei Intoxikationen oder bei Urämie infolge chronischer Niereninsuffizienz, den Anstieg mehrerer Isoenzyme im Serum. Wenn auch die Isoenzymauftrennung der Aldolase bei diesen Krankheitsbildern, die wir als Beispiel für primär multiple Organschädigungen gewählt haben, sicher nur von begrenztem differentialdiagnostischen Interesse ist, so zeigen unsere Ergebnisse dennoch, daß sehr häufig Zelluntergänge in Organen vorkommen, die klinisch nicht im Vordergrund stehen. Systematische Untersuchungen anderer Enzymsysteme, die in multiplen molekularen Formen vorkommen, müssen zeigen, inwieweit bei bestimmten Krankheitsbildern, die sich durch multilokuläre Organschädigungen auszeichnen (Arzneimittelschädigungen, endokrine Komata, chronische Niereninsuffizienz, endogener Leberausfall (insbesondere bei portosystemischer Enzephalopathie), jedoch auch Krankheitsbilder, die primär auf ein Organ zen-

triert zu sein scheinen, wie Lungenembolien, Myocardinfarkt, etc.) für den Verlauf und die Behandlung klinisch wichtige Daten gewonnen werden können.

Diese Ergebnisse beweisen erneut, daß Isoenzymauftrennungen, von Gesamtzym-Aktivitäten eine zuverlässige Organzuordnung erlauben (solange keine Hybridbildung vorliegt), multiple Organschäden aufdecken und geringere Schädigungen eines Organs mit Erhöhung eines Isoenzym nachweisen, auch wenn diese Erhöhung nicht ausreicht, um die Gesamtzym-Aktivität im Serum in den pathologischen Bereich zu steigern. Die differentialdiagnostischen Anwendungsmöglichkeiten der Aldolase in der klinisch-chemischen Routine-Diagnostik bei internen Erkrankungen ist sicher begrenzt. Zum Einen gehört die Aldolase-Gesamtaktivität heute nicht mehr zum Routineprogramm der Serum-Enzymbestimmungen (6,7), so daß Erfahrungen mit der Bestimmung dieses Enzyms erst wieder gesammelt werden müssen. Zum anderen ist die Differentialdiagnose zwischen Muskel- und Leberschädigung theoretisch kein klinisches Problem. Allerdings gibt es durchaus kombinierte Muskel- und Leberschädigungen, die bisher der klinischen Aufmerksamkeit entgehen; so ist ein sekundärer Leberschaden bei Herzinfarkt offensichtlich sehr viel häufiger als auf Grund klinischer Befunderhebung vermutet wird (40,41,64,65) und unsere Untersuchungen bei Leberzirrhose können so interpretiert werden, daß ein Muskel-Isoenzymausstrom bei chronischen Lebererkrankungen kein seltenes Ereignis darstellt. Hier ist die Differenzierung nach dem echten hepatischen Anteil der Gesamt-Enzymaktivität diagnostisch und eventuell bei immunsuppressiver Behandlung auch diagnostisch wichtig. Darüberhinaus sind multiple Organschädigungen per se sehr viel häufiger als auf Grund von Gesamt-Enzymaktivitäten oder

Enzymmustern man annehmen kann. Bei der Lactat-Dehydrogenase zeigten über 30 % aller untersuchten Patienten mit erhöhter LDH-Aktivität im Serum multiple Organschädigungen (40). Wahrscheinlich trifft dies auch für die Aldolase zu, insbesondere bei Erkrankungen, die wie z. B. Intoxikationen von vornherein mit multipler Organschädigung beginnen. Weitere Untersuchungen müssen klären, inwieweit die routinemäßige Isoenzymdifferenzierung in diesen Fällen klinisch relevante Hinweise geben kann. Wenn auch zum gegenwärtigen Zeitpunkt die differentialdiagnostische Bedeutung der Auftrennung der Aldolase in ihre Isoenzyme begrenzt ist, so weisen unsere Untersuchungen doch darauf hin, daß die Immuntitration durch Messung des nach Zugabe präzipitierender Antikörper im Überstand verbleibenden Isoenzymaktivitätsanteils eine einfache, gut reproduzierbare und in der Routinediagnostik im Serum (bei insgesamt sehr niedriger Gesamtaktivität) gut anwendbare Methode zur Auftrennung von Gesamtaktivitäten in ihre Isoenzyme ist. Unsere Untersuchungen an der Aldolase können somit als Modellbeispiel für die klinische gute Anwendbarkeit der Methode für diejenigen Enzyme gelten, die bei internen Erkrankungen besonders erfolgversprechend sind (Kreatinphosphokinase, Hexokinase, alkalische Phosphatasen und Transaminasen).

VII. Zusammenfassung

Es wurde eine Methode zur immunologischen Differenzierung der Aldolase-Isoenzyme durch Präzipitation der genetisch determinierten Aldolase-Untereinheiten durch monospezifische Antiseren entwickelt. Die Verteilung der Aldolase-Isoenzyme wurde in 29 verschiedenen normalen menschlichen Organen, in 36 verschiedenen Abschnitten derselben Organe sowie in 25 verschiedenen pathologischen Geweben gemessen.

Die differentialdiagnostische Bedeutung der Aldolase-Isoenzymbestimmung im Serum wurde bei 18 akuten und 102 chronischen Lebererkrankungen untersucht. Das Aldolase-Isoenzymmuster bei primär multipler Organschädigung wurde am Beispiel von 15 Patienten mit Intoxikationen bzw. Patienten mit Urämie bei chronischer Niereninsuffizienz gemessen.

Die Immuntitration der Aldolase-Isoenzyme ist eine gut reproduzierbare, einfache, für die Routinediagnostik geeignete Methode zur Differenzierung der Aldolase und anderer Enzyme in ihre Isoenzyme, die in niedriger Konzentration im Serum vorkommen und mit anderen Methoden nicht getrennt werden können.

Abkürzungen und Enzyme

Aldolase	:	Fructose-1.6-diphosphat-D-Glycerinaldehyd-3-phosphat Lyase (E.C.4.1.2.13)
DAP	:	Dihydroxyacetonphosphat
Fru-1.6-P ₂	:	Fructose-1.6-diphosphat
Fru-1-P	:	Fructose-1-phosphat
GAP	:	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GDH	:	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
LDH	:	Lactat-Dehydrogenase
NAD	:	Nicotinamin-adenin-dinucleotid
NADH	:	reduziertes Nicotinamin-adenin-dinucleotid
TIM	:	Triosephosphat-Isomerase

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ALDOLASE, TEST-FIBEL, Boeringer, Mannheim
- 2) ALLEN, B.L., GRACY, R.W. and B.G.HARRIS: Studies on aldolase from human cardiac tissue, Arch. Biochem.Biophys. 155 (1973) 325
- 3) AMELUNG, D.: Fermentdiagnostik interner Erkrankungen, Thieme, Stuttgart, 1974
- 4) BEISENHERZ, G., BOLTZE, H.J., BÜCHER, Th., ZOK, B. GABBADE, K.H., MEYER-APENDT, E. und G.PFLEIDERER: Z.Naturforsch. 83 (1953) 555
- 5) BERGMAYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse, 1974
- 6) BRUNS, F.H.: Bestimmung und Eigenschaften der Serumaldolase, Biochem. Z. 325 (1954) 156
- 7) BRUNS, F.H.: Über Esterasen, Nucleasen, glycolytische Fermente und Transaminasen des Blutserums, Clin. chim.Acta 2 (1957) 257
- 8) CHAN, W., MORSE, D.E. and D.L.HORECKER: Nodidentity of subunits of rabbit muscle aldolase, Proc.Nat. Acad. Sci. 57 (1967) 1013
- 9) COLOMBIO, J.P., RICHTERICH, R. und E.ROSSI: Serumkreatinphosphokinase: Bestimmung und diagnostische Bedeutung, Klin.Wschr.40 (1962) 37
- 10) DIKOW, A.L.: Isoenzymfraktionen der Fructose-Phosphat-Aldolase im Serum und verschiedenen Organen des Menschen, Z.Klin.Chem.klin.Biochem.6 (1968) 386
- 11) DIKOW, A.L., JECKEL, D. und G.PFLEIDERER: Isolierung und Charakterisierung von Aldolase A, B und C aus menschlichen Organen, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352 (1971) 1151
- 12) DREYFUS, J.C., SHAPIRA, G., RESNAIS, B. und L.SCEPAT: La creatinkinase serique dans le diagnostic de l'infarctus myocardique, Rev.franc.Et.clin.biol. 5 (1960) 386

- 13) DREYFUS, J.C., SHAPIRA, G. und F. SHAPIRA: Biochemical study of muscle in progressive muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* 33 (1973) 429
- 14) EAGLES, P.A.M. and I. MUZAFFAR: A comparative study of Aldolase from human muscle and liver. *Biochem. J.* 133 (1973) 429
- 15) ENZYME NOMENCLATURE, "Recommendations (1972) of the International Union of pure and applied chemistry and the International Union of Biochemistry", Elsevier Publ., Amsterdam, 1973
- 16) FORSTER, G. und J. ESCHER: Die Kreatinphosphokinase in der Diagnostik von Herzinfarkt und Myopathie, *Helv. med. Acta* 28 (1961) 513
- 17) FOXWELL, C., BUCK, G.M. and D.N. BARON: Preparation of isolated multiple forms of rabbit brain aldolase, *Biochem. J.* 110 (1968) 721
- 18) FRÖHLICH, C.H.: Die Bedeutung von Isoenzymbestimmungen der Lactatdehydrogenase für die Klinische Diagnostik in ENGLHARDT, A. und H. LOMMEL: Serumproteine-Methodische Fortschritte im medizinischen Laboratorium. Bd. I, Verlag Chemie, Weinheim/ Bergstrasse, 1975, S. 163
- 19) FRÖHLICH, C.H. und E. KURRLE: Zur Bedeutung unterschiedlicher Eliminationskonstanten von LDH-Isoenzymfraktionen für die Zusammensetzung von SLDH-Verteilungsmuster beim Menschen. *Klin. Wschr.* 47 (1969) 903
- 20) GEMMP-FRIEDRICH, W. und W. PRELLWITZ: Aktivitätsbestimmung der Isoenzyme der Aldolase im menschlichen Serum mit Hilfe präzipitierender Antikörper. *Klin. Wschr.* 53 (1975) 1
- 21) GERLACH, U.: Pathologischer Übertritt von Sorbitdehydrogenase ins Blut bei Lebererkrankungen. *Klin. Wschr.* 33 (1957) 1144
- 22) GÜRTLER, B., BALLEY, C. und F. LEUDTHARDT: Reindarstellung und Eigenschaften der menschlichen Leberaldolase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352 (1971) 1455

- 23) HASCHEN, R.J.: Enzymdiagnostik, G. Fischer, Stuttgart, 1970
- 24) HESS, B.: Enzyme im Blutplasma, G. Thieme, Stuttgart, 1962
- 25) IKEHARA, Y. und H. ENDO: The identity of the aldolases isolated from rat muscle and primary hepatoma. Arch. Biochem. Biophys. 136 (1970) 491
- 26) IKEHARA, Y., YANAGI, S. and H. ENDO: Comparative studies on muscle aldolase purified from rat, rabbit, human, pigeon and hen. J. Biochem. 66 (1969) 493
- 27) JOCKERS-WRETOU, E., GRABERT, K. und G. PFLEIDERER: Quantitative immunological determination of creatine kinase isoenzymes in serum. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13 (1975) 85
- 28) JOCKERS-WRETOU, E. und G. PFLEIDERER: Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method. Clin. chim. acta 58 (1975) 223
- 29) KAWABE, S., MATSUSHIMA, T. and T. SUGIMARA: Crystallization and properties of aldolase from an transplantable rat sarcoma. Cancer Res. 29 (1969) 2075
- 30) KOWALEWSKI, S.: Die Isoenzyme der Lactathydrogenase, Thieme, Stuttgart, 1972
- 31) LANG, N. und N. MASSEPAT: Immunologie und Enzymkinetik der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (PGT) ; II. Mitteilung: Untersuchungen zur Isoenzym-Organ- und Speziespezifität. Klin. Wochr. 43 (1965) 597
- 32) LANG, H., RICK, W. und L. RÖKA: Optimierung der Diagnostik, Springer, Heidelberg-Berlin-New-York (1973) S. 222 ff
- 33) LATITNER, A. and A. W. SKILLEN: Isoenzymes in biology and medicine. Academic Press, London und New York (1968)
- 34) LAWRENCE, S. H.: The zymogram in clinical medicine. C. C. THOMAS, Publ. Springfield/III. (1964)
- 35) LEHMANN, F.-G. und D. LEHMANN: Regen-Isoenzym: Isolierung der alkalischen Phosphatase aus menschlicher Plazenta und Entwicklung einer empfindlichen Methode für die Tumordiagnostik. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 80 (1974) 1658
- 36) LEHMANN, F.-G.: Immunological methods for human placental alkaline phosphatase (Regan-Isoenzyme). Clin. chim. acta, 1975, im Druck

- 37) LEHMANN, F.-G.: Immunological relationship between human placental and intestinal alkaline phosphatase. *Cli. chim. acta*, 1975, im Druck
- 38) LEHMANN, F.-G.: Isoenzyme in der Diagnostik-Anwendung und Methodik, in: ENGLHARDT, A. und H. LOMMEL: Serumproteine-, Methodische Fortschritte im medizinischen Laboratorium, Bd. I, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1975, S. 135
- 39) LEHMANN, F.-G. und K. W. SCHNEIDER: Die enzymatische Methode des Herzinfarktes. IV. Mitteilung: Serumenzymmuster beim Herzinfarkt. *Enzym. biol. clin.* 6 (1966) 66
- 40) LEHMANN, F.-G., SCHNEIDER, K. W., SCHERNIG, G. und V. KOCH: Enzymelektrophorese bei internen Erkrankungen. Methodische und klinische Untersuchungen zur differentialdiagnostischen Bedeutung der elektrophoretischen Auftrennung der Lactatdehydrogenase in Isoenzyme. *Zschr. Vitamin-, Ferment-, Hormonforschung* 14 (1967) 301
- 41) LEHMANN, F.-G., SCHNEIDER, K. W. und H. MENGE: Die enzymatische Diagnostik des Herzinfarktes. II. Mitteilung: Die Bestimmung von organspezifischen Enzymen: Kreatinphosphokinase und Myokinase. *Enzym. biol. clin.* 6 (1966) 36
- 42) Markert, C. L.: The molecular basis for isoenzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1968) 14
- 43) NEUMANN, S. und G. PFLEIDERER: Immunological specificity of the isoenzymes I and III of human hexokinase (ATP: D-hexose-6-phosphotransferase, E.C 2.7.1.1.). Estimation of isoenzyme pattern by quantitative immunotechniques. *Biochim. biophys. acta.* 334 (1974) S. 343
- 44) NEUMEYER, D. und M. KNEDEL: Immunologischer Nachweis von Creatinkinase-MB im Serum beim Myokardinfarkt. *Klin. Wschr.* 53 (1975) 329
- 45) NISSELBAUM, J. S. and O. BODANSKY: Reactions of human tissue lactic dehydrogenase with antisera to human heart and liver lactic dehydrogenase. *J. biol. Chem.* 236 (1961) 401
- 46) NORDMANN, Y.: A shift of liver aldolase towards the muscle types in hepatoma, Immunological study. *European, J. Cancer* 5 (1969) 485

- 47) NORDMANN, Y. und F. SHAPIRA: Muscle type isoenzymes of liver aldolase in hepatomas. *European, J. Cancer* 3 (1967) 247
- 48) NORDMANN, Y., SHAPIRA, F. and J. C. DREYFUS: A structurally modified liver aldolase in fructose intolerance: Immunological and kinetic evidence. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 31 (1968)
- 49) PENHOET, E. E., KOCHMANN, M. and W. J. RUTTER: Molecular and catalytic properties of aldolase C. *Biochemistry* 8 (1969) 4396
- 50) PENHOET, E. E. and W. J. RUTTER: Catalytic and immunochemical properties of homomeric and heterotomic combinations of aldolase subunits. *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 318
- 51) Pflleiderer, G., DIKOW, A. L. und F. FALKENBERG: Quantitative Bestimmung genetisch determinierter Isoenzyme mittels Immuntitration. Verteilungsmuster der Aldolase A, B und C in menschlichen Organ- und Gewebsextrakten, sowie in normalen und pathologischen Seren. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. chem.* 355 (1974) 233
- 52) REICHERD, H.: Ornithine Carbamyl Transferase aktivität in human tissue homogenates. *J. Lab. Clin. Med.* 56 (1960) 218
- 53) RENSING, U., SCHMID, A., CHRISTEN, PH. and F. LEUTHART: Purification and some properties of aldolase-isoenzymes from bovine brain and muscle. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348 (1967) 1001
- 54) RENSING, U., SCHMID, A. und F. LEUTHARDT: Veränderungen der Isoenzygmuster der Aldolase aus Rattenorganen während der Entwicklung. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348 (1967) 921
- 55) RYSSSEN, R. und L. VANDENBRIESSCHE: Enzymes in clinical chemistry, *West-European Symposium on clinical chemistry. Vol. 4*, Elsevier Publ. Amsterdam-London-New-York, 1965
- 56) SHAPIRA, F., DREYFUS, J. C. and G. SCHAPIRA: Fetal-like patterns of lactic-dehydrogenase and aldolase-isoenzymes in some pathological conditions. *Enzym. biol. clin.* 7 (1966) 98

- 57) SCHAPIRA, F. und A. HATZFELD: Resurgence of two fetal molecular forms of aldolase in hepatoma, in: Harris, R., Allin, P. and D. Visa: Cell Differentiation, Munksgaard, Copenhagen, 1972
- 58) SCHAPIRA, F., HATZFELD, A. and M. D. REUBER: Fetal pattern of aldolase in transplantable hepatomas. Cancer. Res. 31 (1971) 1224
- 59) SCHAPIRA, F. et A. JOSIPOWICZ: Anomalies de type foetal des isoenzymes de l'aldolase et de la lactico-deshydrogenase dans de hepatomes ascitiques, C.R. Seances Biol. 164 (1970) 31
- 60) SCHAPIRA, F. and Y. NORDMANN: Presence de trois types d'Aldolase dans le foie humain. Clin. chim. acta 26 (1969) 189
- 61) SCHAPIRA, F., REUBER, M. D. and A. HATZFELD: Resurgence of two fetal-type of aldolase ("A" und "C") in some fast-growing hepatomas. Biochem. Biophys. Res. Commun. 40 (1970) 321
- 62) SCHMIDT, E. und F. H. SCHMIDT: Enzymbestimmungen im Serum bei Lebererkrankungen. Enzym. biol. clin. 3 (1964) 476
- 63) SCHMIDT, E. und F. H. SCHMIDT: Kleine Enzykfibel, Boeringer, Mannheim, 1973
- 64) SCHNEIDER, K. W. und F.-G. LEHMANN: Enzymdiagnostik und Klinik von Reinfarkt und postinfarktionelem Leberschaden. Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 72 (1966) 914
- 65) SCHNEIDER, K. W., LEHMANN, F.-G. und G. SCHERING: Die enzymatische Diagnostik des Herzinfarktes, III. Mitteilung: LDH-Isoenzyme beim Herzinfarkt. Enzym. biol. clin. 6 (1966) 52
- 66) SCHREIBER, F.-K.: Myokinasebestimmungen in der Diagnostik des Herzinfarktes. Klin. Wschr. 42 (1964) 478
- 67) SHIMIZU, H. and H. OZAWA: Amino acid composition and subunits structure of rabbit-muscle aldolase. Biochem. Biophys. acta. 133 (1967) 195
- 68) SHUGAR, D.: Enzymes and isoenzymes, structure, properties and function. Academic Press, London und New-York, 1970
- 69) SUGIMARA, T., SATO, S. and S. KAWABE: The presence of aldolase "C" in rat hepatoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39 (1970) 626

- 70) TZVETANOVA, E.: Aldolase isoenzymes in the serum of patients with neuromuscular diseases. Clin.chim.acta 31 (1971) 283
- 71) TZVETANOVA, E.: Aldolase isoenzyme in serum and muscle from patients with progressive muscular dystrophy and from human foetus. J. neurol. Sci. 14 (1971) 483
- 72) VOLK, B.W., LOSNER, S. and ST.M.ARONSON: Amer. J.med. SCI. 232 (1956) 38
- 73) WEBER, H. und T.WEGMANN: Atlas der Klinischen Enzymologie, Thieme, Stuttgart, 1968
- 74) WEBER, H. und T.WEGMANN: Der Nachweis von Pankreopathien durch Bestimmungen der Serumlipase mit Hilfe einer neuen Methode. Dtsch. med. Wschr. 90 (1965) 1203
- 75) WEINHOUSE, S., SHATTON, J.B., WAYNE, E.C., FARINA, F.A. and H.P.MORRIS: Isoenzymes in relation to differentiation in transplantable rat hepatomas. Gann Monogr. Cancer Res. 13 (1972) 1
- 76) WILKINSEN, J.H.: Isoenzymes, E. and F.N.SPON Publ., London, 1965
- 77) WURZBURG, U., WILZ, J., HENNRICH, N. und H.LANG: Quantitative immunologische Bestimmung der Aldolase-Isoenzyme im Serum. Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 12 (1974) 176
- 78) ZONDAG, H.A.: Bepaling en diagnostische betekenis van de melkzuurdehydrogenase iso-enzymen. Inaug.Diss. Groningen, (1964)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor
Lehmann herzlich für die Überlassung des Themas
danken.

Lebenslauf

Am 1.8.1946 wurde ich als Sohn des praktischen Arztes Heinz Kornacher und seiner Ehefrau Margot geb. Gissmann in Eutin geboren. Von 1953 - 1957 besuchte ich die Volksschule in Siblin/Ostholstein, anschließend den humanistischen Zweig des Katharineums zu Lübeck, wo ich - von Oktober 1964 - September 1966 durch Aufenthalt in der Lungenheilstätte Mölln unterbrochen - am 19.5.1969 die Reifeprüfung ablegte. Nach dem Abitur begann ich das Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg, wo ich am 25.3.1971 die Naturwissenschaftliche - und am 18.9.1972 die Ärztliche Vorprüfung bestand. Im SS 1973 studierte ich an der Universität Wien, danach kehrte ich nach Marburg zurück und schloß dort im Dezember 1975 mein Medizinstudium ab.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten:

In Marburg:

Ammon, Arndt, Blank, Bommer, Braasch, Buchholz,
Daume, Dehnicke, Dimroth, Exner, Friederich, Graul,
Haberich, Hammelmann, Hardewig, Havemann, Heene,
Hensel, Hildebrand, Hilgermann, Hort, Jacob, Kalb-
fleisch, Karlson, Klaus, Koecke, Koransky, Linne-
weh, Mannheim, Martini, Oepen, Pots, Richter,
Rohen, Rodeck, Schmitz-Moormann, Schneider, Seidel,
Siegert, Straub, Thoenes, Walcher, Wehrmeyer, Wendt

In Wien:

Asperger, Chiari, Deutsch, Kratochwil, Langer,
Moser, Obiditsch-Mayer, Navratil, Novotny, Tapp-
einer, Slezak

